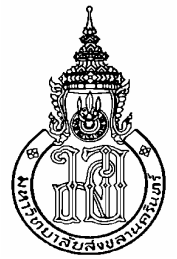


การรอดชีวิตของโปรไบโอติกโดยใช้สารพรีไบโอติกในผลิตภัณฑ์ซินไบโอติก

Survival of Probiotic Bacteria by Prebiotic in Synbiotic Product

พัชรวรรณ รัตนอุบล

Patcharawan Rattanaubon

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Biotechnology

Prince of Songkla University

2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การรอดชีวิตของโปรไบโอติกโดยใช้สารพรีไบโอติกในผลิตภัณฑ์ซินไบโอติก
ผู้เขียน นางสาวพัชรวรรณ รัตนอุบล
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	**คณะกรรมการสอบ**
.....	.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพิชญา จันทะชุม)
	.....กรรมการ
	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี)
	.....กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การรอดชีวิตของโปรไบโอติกโดยใช้สารพรีไบโอติกในผลิตภัณฑ์ซินไบโอติก

ผู้เขียน นางสาวพัชรวรรณ รัตนอุบล

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

การทำแห้งโปรไบโอติก 4 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034, *Bifidobacterium longum* DSM 20215 และ *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 พบว่า *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 มีการลดลงของเซลล์ 0.18 log CFU/มิลลิลิตร หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ได้แก่ แหล่งคาร์บอน การเติม crude fiber และสภาวะในการเจริญ (พีเอชและอุณหภูมิ) ซึ่งการเติมสารสกัดด้วยน้ำของถั่วเหลือง 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตของเชื้อ มีการลดลงของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 0.11 log CFU/มิลลิลิตร หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และเมื่อเติม crude fiber ของถั่วเขียวชนิดละเอียด 2 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารสกัดด้วยน้ำของถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 มีการรอดชีวิตดีกว่า การไม่เติม crude fiber การเติม crude fiber ของถั่วเหลือง ข้าวโพด และ EPSs

การเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 ในอาหารเลี้ยงเชื้อพีเอช 6.5 วางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำให้เชื้อทนต่อการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง การรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 ที่มีการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ระยะการเจริญ late log phase, mid stationary phase และ late stationary phase ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) และ พบว่า ซูโครส เป็นสาร cryoprotectant ที่ดีที่สุด รองลงมาคือสารสกัดข้าวโพด เมื่อเทียบกับ นมพร่องมันเนย (skim milk), Fructo-oligosacchrides (FOS), สารสกัดถั่วเหลือง, crude fiber ถั่วเหลือง, crude fiber ข้าวโพด, สารสกัดถั่วเขียว, crude fiber ถั่วเขียว A,B และ EPSs

Lactobacillus plantarum TISTR 875 ที่ผ่านการเลี้ยงด้วยอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีการใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน มีการเติม crude fiber จากถั่วเขียวชนิดละเอียด พีเอชอาหาร 6.5 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ มีการเติมสารสกัดจากข้าวโพด เป็นสาร cryoprotectant เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ซินไบโอติก แล้วนำไปแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาในรูปแบบผงมีการ

รอดชีวิตดีกว่าเซลล์อิสระ (เลี้ยงด้วยอาหาร MRS ปกติและไม่มีการทำแห้ง) เมื่ออยู่ในสภาวะเป็นกรดที่พีเอช 2 ส่วนในสภาวะที่เป็นเกลือน้ำดีเซลล์ที่ผ่านการทำแห้งและเซลล์อิสระไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในถุงลามิเนตสภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส มีการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 สูงกว่า การบรรจุในขวดแก้วที่มีการเติมไนโตรเจน และการเติมผลิตภัณฑ์รูปแบบผงในน้ำนมและน้ำส้มพาสเจอไรซ์เชื้อมีการรอดชีวิตใกล้เคียงกัน เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ซึ่งมีปริมาณเชื้อที่เหลืออยู่เพียงพอที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายผู้บริโภค คือ 6.87 และ 6.88 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ

Thesis Title	Survival of Probiotic Bacteria by Prebiotic in Synbiotic Product
Author	Miss Patcharawan Rattanaubon
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2009

ABSTRACT

Freeze-drying survival of probiotic bacteria including *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034, *Lactobacillus plantarum* TISTR 875, *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 and *Bifidobacterium longum* DSM 20215 were determined *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 showed the lowest cell reduction of 0.18 log CFU/ml after freeze-drying at freezing temperature of -196°C. The factors affecting growth and survival of probiotics after freeze-drying, including carbon sources, addition of crude fiber and growth condition (pH and temperature) were studied. Addition of 2 % water extract from soybean as a carbon source for probiotic growth showed the lowest cell reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 (0.11 log CFU/ml) after freeze-drying. When 2 % of mungbean crude fiber was added in the cultivation medium contained water extract from soybean as a carbon source, *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 showed greater survival compared to control (without crude fiber) and those grown in the presence of soybean crude fiber, corn crude fiber and exopolysaccharides (EPSs).

Lactobacillus plantarum TISTR 875 cultivated at pH 6.5 and temperature of 37°C exhibited the most resistant to freeze-drying. Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 harvested at late log phase, mid stationary phase and late stationary phase were not significantly difference ($p>0.05$). Sucrose and corn extract were the best cryoprotectant compared to skim milk, fructo-oligosaccharide (FOS), EPSs, soybean extract,vmungbean extract, soybean fiber, corn fiber and mungbean fiber. Freeze-dried *Lactobacillus plantarum* TISTR 875, grown under optimal condition, including addition of 2 % water extract from soybean and 2 % mungbean crude fiber in the growth medium under pH 6.5 and temperature of 37°C with corn extract as a cryoprotectant (symbiotic product) showed higher survival in acidic condition (pH 2.0) than the control cells (grown in MRS broth without soybean extract and mungbean crude fiber). Freeze-dried *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 stored in vacuum aluminium foil bag

showed higher survival than glass bottle with N_2 at 5°C for 8 weeks. Milk and Orange juice pasteurize with freeze-dried *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 showed number of cell after 6 weeks 6.87 and 6.88 log CFU/ml.

สารบัญ

		หน้า
สารบัญ		(8)
LIST OF TABLES		(9)
LIST OF FIGURES		(10)
บทที่		
1	บทนำ	1
	บทนำต้นเรื่อง	1
	การตรวจเอกสาร	3
	วัตถุประสงค์	24
2	วิธีการวิจัย	25
	วิธีดำเนินการ	25
	วัสดุและอุปกรณ์	33
3	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	36
4	บทสรุปและข้อเสนอแนะ	63
เอกสารอ้างอิง		65
ภาคผนวก		75
ประวัติผู้เขียน		86

LIST OF TABLES

Table		Page
1.	Lactic acid bacteria used as commercial probiotics……	5
2.	Different definitions of dietary fiber……..	13
3.	Comparison of total dietary fiber content in cereal grains…….	14
4.	Survival of probiotics before and after freeze-drying……...	82
5.	Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract, corn extract, mungbean extract, FOS, sucrose glucose as carbon sources and non carbon source before and after freeze-dry….....	82
6.	Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract as carbon sources and crude fiber 2 % from soybean, corn, mungbean(A and B), EPSs and control not crude fiber before and after freeze-dry……	83
7.	Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract as carbon sources and 2 % crude fiber from mungbean B and pH of medium such as 4, 5, 6.5 and 7 before and after freeze-dry……	83
8.	Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract as carbon sources, 2 % crude fiber from mungbean B, pH 6.5 and incubated at 30, 37 and 45°C before and after freeze-dry……...	84
9.	Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract as carbon sources, 2 % crude fiber from mungbean B, pH 6.5, incubated at 37°C and harvested cell at late log phase, mid stationary phase and late stationary phase before and after freeze-dry……	84
10.	Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract as carbon sources, 2 % crude fiber from mungbean B, pH 6.5, incubated at 37°C, harveated cell at mid stationary phase and used various cryoprotectants before and after freeze-dry…….	85

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.	Water phase diagram……...	19
2.	Freeze drying process……..	21
3.	Effect of freezing temperature on cell reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034, *Bifidobacterium longum* DSM 20215 and *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456.....	38
4.	Growth of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 cultivated in MRS medium contained soybean extract, corn extract, mungbean extract, FOS, sucrose, glucose as carbon sources.……..	40
5.	Effect of freeze-drying on cell reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract, corn extract, mungbean extract, FOS, sucrose glucose as carbon sources.……	41
6.	Growth of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 cultivated in MRS medium contained soybean extract as carbon sources and crude fiber 2 % from soybean, corn, mungbean A , mungbean B and EPSs.…….....	42
7.	Effect of freeze-drying on cell reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 grown in MRS medium containing 2 % soybean extract and crude fiber 2 % from soybean, corn, mungbean A, mungbean B and EPSs.……	43
8.	Effect of pH on growth of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 grown in MRS medium containing 2 % soybean extract and 2% mungbean B crude fiber.…**…….....**	44
9.	Effect of freeze-drying on cell reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 grown in MRS medium containing 2 % soybean extract and 2 % mungbean B crude fiber at pH 4, 5, 6.5 and 7.…….	45
10.	Effect of temperature on growth of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 cultivated in MRS medium containing 2 % soybean extract , 2 % mungbean B crude fiber , pH 6.5 and incubated at 30, 37 and 45°C…….....	46

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		Page
11.	Effect of freeze-drying on cell reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 grown at 30, 37 and 45°C in MRS medium containing 2 % soybean extract, 2 % mungbean B crude fiber and pH 6.5.. …….....	47
12.	Change of pH (▲) and Growth (■) of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 cultivated in MRS medium containing 2 % soybean extract, 2 % mungbean B crude fiber and pH 6.5 at 37°C…….	48
13.	Effect of cell harvested at late log phase, mid stationary phase and late stationary phase on the reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 grown in MRS medium containing 2 % soybean extract and 2 % mungbean B crude fiber, pH 6.5 at 37°C after freeze-dry. …….	49
14.	Effect of cryoprotectants on cell reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 grown in MRS medium containing 2 % soybean extract, 2 % mungbean B crude fiber, pH 6.5 at 37°C and harveated at mid stationary phase after freeze-dry. …….	51
15.	Scanning electron micrograph (SEM) of *Lactobacillus plantarum* after freeze-drying with sucrose (A) skim milk (B) and corn extract (C) as cryoprotectants….....	53
16.	Cell reduction of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 with sucrose (A) and corn extract (B) as cryoprotectant (closed symbols) and free cell (opened symbols) in acidic condition with pH 2 (■,□),3 (▲,△), 4 (●,○) and 5 (◆,◇)……..	55
17.	Number of freeze-drying *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 with sucrose (A), corn extract (B) as cryoprotectant and free cell in 3 % bile salt condition with pH 8 at 0 and 4 hours.……	56
18.	Viable population (A) and moisture content (B) of freeze-drying *Lactobacillus plantarum* with corn extract as cryoprotectant stored in vacuum aluminium foil and glass bottle with N_2 at 5°C and room temperature.....	58

LIST OF FIGURES (Cont.)

Figure		Page
19.	Viable population (A) and moisture content (B) of freeze-drying *Lactobacillus plantarum* with sucrose as cryoprotectant stored in vacuum aluminium foil and glass bottle with N_2 at 5°C and room temperature.....	59
20.	Change of pH (A) and viable cell counts (B) in pasteurized milk and orange juice with and with out freeze dried *Lactobacillus plantarum* addition during 6 weeks storage at 5°C……...	62
21.	Standard curve of reducing sugar…….....	80
22.	Standard curve of total sugar……..	81

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันโลกมีการเปลี่ยนแปลงไป มีวิวัฒนาการใหม่ๆเข้ามามากมาย การดำเนินชีวิตของคนก็เปลี่ยนไป มีการแข่งขันกับเวลาจึงทำให้ความพิถีพิถันในการเลือกรับประทานอาหารน้อยลง รวมทั้งเกิดภาวะความเครียด การใช้สารปฏิชีวนะอย่างพร่ำเพรื่อ ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลต่างๆของร่างกายถูกรบกวน ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นต้องได้รับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เข้าสู่ร่างกาย เพื่อเป็นการรักษาสภาพสมดุลของจุลินทรีย์ภายในร่างกาย ทำให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพและช่วยให้ดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างปกติสุข (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2541) โดยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อร่างกายนี้ คือ โปรไบโอติก (Probiotics) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่บริโภคเสริมเข้าไปแล้วก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพผู้บริโภค โดยจะช่วยปรับปรุงสมดุลของแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ (Fuller, 1993) นอกจากนี้แบคทีเรียโปรไบโอติกยังสามารถป้องกันการเกิดโรคท้องร่วง ท้องผูก การอักเสบของลำไส้ ป้องกันการกลับมาเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือด เป็นต้น (Gibson and Roberfroid, 1995) จุลินทรีย์ที่จัดว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกควรมีคุณสมบัติหลักๆ ได้แก่ เป็นเชื้อที่อยู่ในระบบลำไส้ตามปกติ โดยสามารถรอดชีวิตจากสภาวะรุนแรงในระบบย่อยอาหารขั้นต้น ทำให้เกิดคุณประโยชน์เมื่ออยู่ในลำไส้ อีกทั้งยังคงความมีชีวิต (viability) และคงมีกิจกรรม (activity) อยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารที่มีการเติมโปรไบโอติกนั้นๆลงไปทั้งในระหว่างการเก็บรักษาจนกระทั่งบริโภค (Lee and Salminen, 1995)

ในปัจจุบันผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกมีทั้งแบบน้ำและแบบผง ซึ่งการทำโปรไบโอติกแบบผงนั้นมีหลายกรรมวิธีด้วยกัน ทั้งทำแห้งแบบพ่นฝอย และ ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเป็นวิธีการโดยทั่วไปที่นิยมใช้กันเนื่องจากสามารถคงคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ไว้ ทั้งยังสะดวกในการนำไปใช้และการเก็บรักษา แต่เมื่อโปรไบโอติกผ่านขั้นตอนการผลิตดังกล่าวแล้วมีผลให้การรอดชีวิตลดลง ดังนั้นจึงมีการเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติก ตั้งแต่ขบวนการเลี้ยงเซลล์โดยใช้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม รวมถึงการใช้สารป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ (cryoprotectant) จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งมีด้วยกันหลายชนิด เช่น น้ำตาล นมพร่องมันเนย และสารกลุ่มพรีไบโอติกที่ไม่สามารถถูกย่อยและดูดซึมในทางเดินอาหารส่วนบนของมนุษย์ ซึ่งสารกลุ่มนี้มีบทบาทในการส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติกด้วย

ปริมาณการรอดชีวิตและกิจกรรมของโปรไบโอติกจึงมีความสำคัญมาก โดย Lee และ Salminen (1995) ได้กล่าวไว้ว่าผลิตภัณฑ์ที่มีโปรไบโอติกจะต้องมีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอย่างน้อยที่สุด 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตรหรือกรัมของผลิตภัณฑ์นั้นๆ ซึ่งเป็นระดับที่เพียงพอที่จะให้ประโยชน์ต่อร่างกายผู้บริโภค การรอดชีวิตของโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ความเป็นกรด-ด่าง วอเตอร์แอกติวิตี้ ปริมาณออกซิเจน ภาวะแข่งขันกับจุลินทรีย์ประเภทอื่น รวมถึงวัสดุที่ใช้ในการทำภาชนะบรรจุและสภาวะที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้โปรไบโอติกต้องรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะที่เป็นกรดของกระเพาะอาหารและต้องทนต่อการทำลายของเอนไซม์และเกลือน้ำดีในลำไส้เล็ก จึงเกิดประโยชน์แก่ผู้บริโภค ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงสนใจนำสารพรีไบโอติกมาเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในสภาวะที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ รวมถึงการรอดชีวิตของโปรไบโอติกเมื่อเสริมในเครื่องดื่มน้ำผลไม้และนม เพื่อให้มีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในจำนวนที่เหมาะสมต่อการบริโภค

การตรวจเอกสาร

1. โปรไบโอติก (Probiotic)

โปรไบโอติก คือ อาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย โปรไบโอติกเป็นแบคทีเรียที่ดีมีประโยชน์ต่อร่างกายเรา เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus thermophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* แบคทีเรียเหล่านี้อาศัยอยู่ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ทำหน้าที่ช่วยย่อยอาหารและผลิตสารอาหารที่ดีมีประโยชน์ ได้แก่ กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน วิตามินเค วิตามินบี และสารปฏิชีวนะธรรมชาติหลายชนิดซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกาย (ธารารัตน์ ศุภศิริ, 2542)

1.1 คุณสมบัติของโปรไบโอติก

1. สามารถสร้างกรดแลคติก และปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

2. สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula, 1998) เช่น *Lactobacillus acidophilus* (ADH) สามารถทนกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์อื่นๆ (Conway *et al*., 1987) *Lactobacillus gasseri* สามารถรอดชีวิตได้มากที่พีเอช 3, 2 และ 1.5 ตามลำดับ (Arihara *et al*., 1998) *Lactobacillus* สายพันธุ์ BFE 1058 และ 1061 มีความสามารถในการทนต่อพีเอชต่ำดีกว่าสายพันธุ์ BFE 1059 (Toit, 1998) และ *Lactobacillus sake* (RM 10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงสุดที่พีเอช 3 (Erkkila and Petaja, 2000)

3. สามารถทนต่อน้ำดีได้ดีเนื่องจากในทางเดินอาหารส่วนต้นโดยเฉพาะบริเวณลำไส้เล็กจะมีเกลือน้ำดีที่หลั่งจากตับอ่อนเข้ามาช่วยในการย่อยอาหารจำพวกไขมัน (Erkkila and Petaja, 2000) จากรายงานของ Shirota (1962) กล่าวว่า *Lactobacillus* ที่ทนต่อเกลือน้ำดีได้สูง ได้แก่ *Lactobacillus bulgaricus, Lactobacillus fermenti, Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* Shirota ทนได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 2, 4, 10, 12 และ 15 ตามลำดับ

4. สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ ซึ่งโดยปกติเชื้อโรคจะเข้าเกาะ และต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น (Peristalsis) (Fuller, 1993) ซึ่งการเกาะเคลือบของโปรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้จะทำให้การย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993) สอดคล้องกับการศึกษาความสามารถของโปรไบโอติกแบคทีเรียพวก *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Bifidobacterium lactis* Bb12, *Lactobacillus pentosus* UK1A, *Lactobacillus pentosus* SK2A, *Enterococcus faecium* M74,

Enterococcus faecium SF273 ในการแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทุกชนิดที่ทดสอบสามารถแย่งยึดเกาะผนังลำไส้กับเชื้อ *Clostridium perfringens* ได้ดี โดยสามารถลดอัตราการยึดเกาะกับผนังลำไส้ของเชื้อ *Clostridium perfringens* จาก 79.1 เปอร์เซ็นต์ เป็น 53.7 เปอร์เซ็นต์ (Rinkinen *et al.,* 2003)

5. สามารถสร้างเอนไซม์ pectinase, β-galactosidase, amylase, protease, lactase และ cellulase มีผลทำให้การย่อย และการใช้ประโยชน์ของสารอาหารต่าง ๆ ดีขึ้น (อุทัย คันโธ, 2535)

6. สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อโรคทั้งที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น hydrogen peroxide และ bacteriocin เป็นต้น (Fuller, 1993) Arihara และคณะ (1998) พบว่า *Lactobacillus gasseri* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลคติกที่พบได้มากในทางเดินอาหารของคนและมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก จะช่วยลดการแพร่กระจายของเชื้อ *Staphylococcus aureus* รวมถึงลดการสร้าง enterotoxin ในระหว่างการหมักไส้กรอกได้ ซึ่งการหมักกรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือแบคเทอริโอซิน ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะกับการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*

7. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ โดยพบว่าใน *Lactobacillus* sp. ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง gamma globulin, gamma interferon และส่งเสริมกิจกรรมของ macrophage ซึ่งเป็นสาเหตุของการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (Fuller, 1993) เมื่อนำ *Lactobacillus* sp. (GG) จากผลิตภัณฑ์นมหรือโยเกิร์ตให้ผู้ป่วยโรคท้องร่วงรับประทาน พบว่า ทำให้ร่างกายผู้ป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้นร้อยละ 90 เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับประทาน *Lactobacillus* sp. (GG) มีการสร้างภูมิคุ้มกันเพียงร้อยละ 46 (Kaila *et al*., 1992)

8. ลดการสังเคราะห์เอมีนที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหารเพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์ของสารต่าง ๆในร่างกาย (อุทัย คันโธ, 2535)

9. ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (colon) โดยไปลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง เช่น β-glucuronidase, azoreductase, nitrate reductase และ β-glucosidase (Kontula, 1998; Renner and Münzner, 1991; Naidu *et al*., 1999; Saarela *et al*., 2000)

10. แย่งอาหารของเชื้อก่อโรค (Fuller, 1993)

11. เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว และสามารถมีชีวิตอยู่ในลำไส้ได้นานประมาณ 24 ชม. (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

12. สร้างสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น folate ช่วยสร้างเม็ดเลือดแดง และวิตามินบี 2 ที่ช่วยบำรุงเส้นผมและเล็บ (Fuller, 1993)

13. ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด (Buke and Gilliland, 1990) โดยพบว่า *Lactobacillus acidophilus* บางสายพันธุ์ช่วยในการควบคุมระดับคอเลสเตอรอลได้ โดยการดูดซึมคอเลสเตอรอลในลำไส้ได้ ซึ่งจากการแยกเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* จากอุจจาระของอาสาสมัคร 9 คน พบว่า *Lactobacillus acidophilus* (O16) สามารถดูดซึมคอเลสเตอรอลได้มากที่สุด คือ 50.9 ไมโครกรัม/มล. และ D5 จะดูดซึมได้น้อยที่สุด คือ 28 ไมโครกรัม/มล.

1.2 เชื้อจุลินทรีย์ที่จัดให้เป็นโปรไบโอติก

เชื้อจุลินทรีย์ที่จัดเป็นโปรไบโอติก โดยส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) ซึ่งได้แก่ Lactobacilli, Streptococci, Enterococci, lactococci, Bifidobacteria ดังแสดงใน Table 1. (Gibson *et al*., 2000)

Table 1. Lactic acid bacteria used as commercial probiotics.

Lactobacilli	Bifidobacteria	Streptococci	Enterococci
Lactobacillus delbrueckii subsp *bugaricus*	*Bifidobacterium bifidum*	*Streptococcus thermophilus*	*Enterococcus faecalis*
Lactobacillus acidophilus	*Bifidobacterium longum*		*Enterococcus faecium*
Lactobacillus rhamnosus	*Bifidobacterium breve*		
Lactobacillus reuteri	*Bifidobacterium infleantis*		
Lactobacillus casei			

ที่มา : Fooks และคณะ (1999)

สำหรับเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่นำมาใช้กับมนุษย์โดยทั่วไปได้แก่ Lactobacilli เช่น *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus delbrueckii* โดยใช้ได้ทั้งในลักษณะสปีชีส์เดียวกันหรือผสมกับเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น และนอกจากนั้นพบว่ายังมี Bifidobacteria เช่น *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* และ Streptococci เช่น *Strepococcus thermophilus* และ Lactococci เช่น *Lactococcus lactis* โดยส่วนใหญ่ใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก โดยจุลินทรีย์เหล่านี้ให้ผลบวกต่อสุขภาพของมนุษย์ ซึ่งประกอบด้วย โรคท้องร่วง โรคท้องผูก อาการอักเสบของลำไส้จากเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค

ภาวะท้องอืดมีลมในกระเพาะอาหาร กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ ภาวะกรดในกระเพาะอาหาร กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การมีระดับคอเลสเตอรอลในเลือดมากกว่าปกติ เป็นต้น (Gibson and Roberfroid, 1995)

1.2.1 แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส ไม่ต้องการอากาศ ลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่า มีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม การจัดเรียงแบคทีเรียแลคติกในสกุลต่างๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะ รูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ รวมถึงความสามารถเจริญได้ในที่มีเกลือความเข้มข้นสูง และการทนต่อกรดหรือด่าง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติกได้แก่ *Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Leuconostoc* (Wood and Holzapfel, 1995)

แบคทีเรียแลคติกที่เป็นโปรไบโอติกมีประโยชน์ในการช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตสที่มีในผลิตภัณฑ์นม ช่วยสร้างวิตามินที่จำเป็น ได้แก่ วิตามิน B1, B2, B6, B12, niacin, folic acid และ pantothenic acid อีกทั้งช่วยเพิ่มความสามารถในการย่อยโปรตีน ช่วยควบคุมรักษาสมดุลในลำไส้และเสริมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Rice, 2002) นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ สารที่แบคทีเรียสร้างขึ้นมีดังนี้

1. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นได้ โดยแบคทีเรียแลคติกสามารถทำปฏิกิริยากับ endogenous thiocyanate ซึ่งเร่งปฏิกิริยาโดย lactoperoxidase เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ Intermediary oxidation ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษานมสดได้โดยไม่ต้องแช่ตู้เย็น

2. Diacetyl (2,3-butanedione) เป็นผลจากการย่อยสารอาหารจากแบคทีเรียแลคติกบางสปีชีส์ เป็นสารให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์นมหมัก และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่ต้องใช้ในปริมาณมาก และทำให้มีกลิ่นรบกวน

3. Reuterin เป็นสารที่มีโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีนและสามารถละลายน้ำได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น ยีสต์ รา รวมทั้งโปรโตซัว จึงสามารถนำไปใช้ในการถนอมอาหารเพื่อลดจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และทำให้อาหารเน่าเสีย

4. Microgard สามารถต่อต้านแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา แต่ไม่ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย กรดโพรพิโอนิก ไดอะซิติล กรดอะซิติก และกรดแลคติก

5. แบคเทอริโอซิน เป็นสารที่มีผลในการยับยั้งในช่วงแคบ เป็นแบคทีเรียที่ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในจีนัสเดียวกัน และยับยั้งในช่วงกว้าง เป็นแบคทีเรียที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

ประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยการนำแบคทีเรียที่แยกได้ประมาณ 1000 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Listeria innoca, Pseudomonas fragi* และ *Lactobacillus bulgaricus* ผลการทดลองพบว่าส่วนใหญ่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 1 ชนิด มีเพียงบางชนิดเท่านั้นที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้มากกว่า 1 ชนิด จึงได้ทำการทดลองเชื้อ *Lactococcus lactis* 280 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 16 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน เช่น สายพันธุ์ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis var diacetylactis* สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ร้อยละ 1 สายพันธุ์ *Lactococuus lactis* ssp. *cremoris* ผลิตได้ร้อยละ 5 และสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ผลิตได้ร้อยละ 9โดยแบค เทอริโอซินที่ผลิตได้จะถูกยับยั้งกิจกรรมโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและทำให้ตกตะกอนได้ (Vandenbergh, 1993) โดยนำมาใช้ในการถนอมอาหารและใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมหวาน เนยแข็ง นม โยเกิร์ต เครื่องดื่ม ผลิตภัณฑ์เนื้อต่างๆรวมถึงผักผลไม้ ซึ่งไนซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้โดยเฉพาะ *Clostridium botulinum, Clostridium tyrobutyricum* และ *Bacillus* sp.

1.2.2 ไบฟิโดแบคทีเรีย (Bifidobacteria)

Bifidobacteria เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในตระกูล Actinomycetaceae มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่าง curved rods และ bifid rod ลักษณะคล้ายอักษรตัว Y นอกจากนี้ยังอาจพบรูปร่างแบบ branced หรือ straight rot และ Unbranched ได้อีกด้วย

คุณสมบัติของไบฟิโดแบคทีเรีย (Bifidobacteria)

Bifidobacteria สามารถสร้างแลคเตส (lactase) ฟอร์เมต และเอธิลแอลกอฮอล์ โดยการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาล ซึ่งในการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ของเชื้อนี้เพื่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ต่างๆนั้น จะมีความแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ จะมีความสามารถในการใช้สารได้ต่างกัน และทำให้เกิดผลิตผลในปริมาณที่ต่างกันด้วย

นอกจากคุณสมบัติดังกล่าวแล้ว เชื้อ Bifidobacteria ยังมีความสามารถในการทนต่อน้ำดี จึงเจริญอยู่ในกระเพาะอาหารและลำไส้ได้ดี และทำให้เอนไซม์ β-galactosidase ที่เชื้อผลิตขึ้นนั้นสามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสได้ ทำให้ร่างกายสามารถนำแลคโตสไปใช้ได้และไม่ก่อให้เกิด

อาการ Loctose intolerance โดยผลที่เกิดขึ้นจะดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่น (พิณทิพย์ รัมภกาภรณ์ และ สุดสาย ตรีวาณิช, 2533)

1.3 ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีโปรไบโอติก

อาหารที่มีเชื้อโปรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นประเภทนมหมัก ปัจจุบันมีการเพิ่มความหลากหลายของแบคทีเรียโปรไบโอติกชนิดต่างๆเพื่อใช้ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกให้มีความหลากหลายมากขึ้น แต่ในผลิตภัณฑ์นมหมักยังคงเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ใช้เป็นตัวกลางในการส่งผ่านเชื้อโปรไบโอติกเข้าสู่ร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้เชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารอื่นๆ เช่น อาหารสำหรับทารก เนยแข็ง เครื่องดื่มจากเวย์ ซุปผลไม้ น้ำผลไม้ และยังใช้ในทางเภสัชกรรม สำหรับในปัจจุบันแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติก ในตระกูล *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ได้รับความสนใจในการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ดังเช่นการทดลองของ Shah และคณะ (1995) ได้ศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium bifidum* ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต 5 ผลิตภัณฑ์ในออสเตรเลียซึ่งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าเชื้อทั้งสองชนิดมีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษามากขึ้นส่วน ภวัต สังขะวัฒนะ (2544) พบว่า การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักคล้ายโยเกิร์ตโดยใช้เชื้อโปรไบโอติกเป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมัก ซึ่งประกอบด้วยเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* La-5, *Lactobacillus casei* Lc-01 และ *Bifidobacterium bifidum* Bb-12 พบว่าสูตรที่เหมาะสมนั้นมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นของ *Lactobacillus acidophilus* จำนวน 1.18×10^9 CFU/กรัม ปริมาณเชื้อเริ่มต้น *Lactobacillus casei* จำนวน 1.95×10^8 CFU/กรัม และ *Bifidobacterium bifidum* จำนวน 6.85×10^9 CFU/กรัม และทำการศึกษาอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ภายใต้อุณหภูมิการเก็บรักษา 5 องศาเซลเซียส โดยพิจารณาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ พบว่าอายุการเก็บรักษาที่เหมาะสม คือ 2 สัปดาห์ นอกจากการใช้กับโยเกิร์ตแล้ว Stanton และคณะ (1998) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการนำเชื้อโปรไบโอติก *Lactobacillus* เพิ่มเข้าไปในระหว่างกระบวนการผลิตเนยแข็งเชดด้า (Cheddar cheese) และพบว่า *Lactobacillus paracasei* สายพันธุ์ NFBC 338 และ NFBC 364 ยังคงมีชีวิตในระหว่างช่วงของการบ่ม และมีปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/กรัม หลังจากการบ่ม 8 เดือน และไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพในด้านลักษณะทางประสาทสัมผัสของเนยแข็งเชดด้า (Cheddar cheese) และ Yoon และคณะ (2005) ได้ศึกษาการหมักน้ำบีทรูท ด้วยเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกสี่สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei, Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus delbrueckii* โดยทำการหมักน้ำบีทรูทที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเชื้อโปรไบโอติกสามารถที่จะใช้น้ำบีทรูทในการหมักให้เกิดกรดแลคติกได้ พบว่า *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus*

plantarum ผลิตกรดแลคติกได้มากกว่าสายพันธุ์อื่นๆและทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำบีทรูทลดลงจากเริ่มต้นที่ 6.3 เหลือ 4.5 เมื่อใช้เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง และพบว่าเมื่อนำไปเก็บรักษาในที่เย็นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เชื้อโปรไบโอติก ทุกสายพันธุ์ยังคงมีจำนวนที่เหลือรอดชีวิตอยู่ประมาณ 10^6-10^8 CFU/มล.

2. พรีไบโอติก (Prebiotics)

พรีไบโอติก คือ องค์ประกอบของอาหารที่ไม่ถูกย่อย โดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นสารอาหารกลุ่มนี้จึงผ่านระบบทางเดินอาหารไปสู่บริเวณลำไส้ใหญ่ในสภาพที่สมบูรณ์ และกลายเป็นอาหารของจุลินทรีย์กลุ่มที่เป็นโปรไบโอติก(Gibson and Roberfroid, 1995) จากการย่อยสารอาหารกลุ่มนี้จะได้สารบางชนิดที่เป็นประโยชน์ซึ่งร่างกายนำกลับไปใช้ประโยชน์ได้หลายชนิด เช่น กรดไขมันสายสั้น (Short Chain Fatty Acid) และผลจากการย่อยยังทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในลำไส้ลดลง ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด อาหารที่มีองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก ได้แก่ ธัญพืช ผัก ผลไม้

2.1 คุณสมบัติของพรีไบโอติก

สารพรีไบโอติกสามารถเคลื่อนไปถึงลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่ถูกย่อย และไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารส่วนบน (Gibson, 2004; Fooks *et al.,* 1999; Kolida *et al.,* 2002) โดยไปส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหาร เช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* ไม่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น *Clostridium perfrigens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในลำไส้ได้ (Gibson and Roberfroid, 1995; Kolida *et al.,* 2002) และส่งผลให้สุขภาพของเจ้าบ้าน (host) ดีขึ้น เช่น ช่วยในการดูดซึมแร่ธาตุ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และเหล็ก (Lopez *et al*., 2000; Van *et al*., 1998) ป้องกันมะเร็งลำไส้ใหญ่ ซึ่ง Gibson และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของ Fructo-oligosacchride และ Inulin ในอาสาสมัคร 100 โดยให้รับประทาน 5-20 กรัมต่อวัน เป็นเวลา 9 สัปดาห์พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ *Bifidobacterium* เพิ่มขึ้น โดยชนิดของสารพรีไบโอติกกลุ่มที่เป็น oligosaccharide เช่น แลคโตส แลคตูโลส แรฟฟีโนส สตาคีโอส และฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) และยังมีสารอื่นๆ ที่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักโดยแบคทีเรียที่มีประโยชน์ เช่น Bifidobacteria และ *Lactobacillus* ในลำไส้ใหญ่ คือ resistant starch (RS), Non-starch polysaccharide (NSP) ทั้งนี้รวมไปถึงสารที่ได้จากพืช เช่น แพคติน เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส กัม และ ไซแลน และนอกจากนี้ mucine glycoprotein ซึ่งผลิตโดย goblet cell ในลำไส้ใหญ่สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักได้เช่นกัน Lee และคณะ (2002) ได้ศึกษาผลของสารไคโตแซนโอลิโกแซคคาไรด์ (COS) ที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. และ

Bifidobacterium bifidum พบว่า COS ช่วยกระตุ้นการเจริญของ *Bifidobacterium bifidum* KCTC 3440 และ *Lactobacillus* sp.

2.2 ชนิดของสารพรีไบโอติก

พรีไบโอติกที่ขายทางการค้าและใช้ในอุตสาหกรรมอาหารอยู่ในกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลที่เป็นหน่วยย่อย 2 -20 มาต่อกันด้วยพันธะโควาเลนท์ (Covalent bond) ซึ่งมีชื่อเรียกว่า พันธะไกลโคซิดิก พรีไบโอติกที่พบมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ พรีไบโอติกที่มีในธรรมชาติซึ่งพบได้ในผักและผลไม้ เช่น กล้วย หน่อไม้ฝรั่ง ถั่ว กลุ่มธัญพืช และพรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์โดยใช้เอนไซม์ โดยในปัจจุบันพรีไบโอติกที่นำมาใช้ทางการค้าและในอุตสาหกรรมอาหารส่วนใหญ่ได้มาจากการสังเคราะห์

2.2.1 พรีไบโอติกที่พบในธรรมชาติ

2.2.1.1 กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Galacto-oligosaccharides, GOS)

กาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีกาแลคโตสเป็นองค์ประกอบ พบในน้ำนมของมนุษย์ น้ำนมวัว โยเกิร์ต และสังเคราะห์มาจากแลคโตส โดยเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (β-galactosidase) เป็นกลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ที่ไม่สามารถย่อยได้ (non-digestible oligosaccharides) โดยเอนไซม์ในร่างกายมนุษย์ จึงเหลือผ่านไปยังลำไส้ใหญ่ได้โดยไม่ถูกย่อยแต่สามารถเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ ผลผลิตหลักที่ได้จากการหมักจะเป็นกรดไขมันสายสั้น (short-chain fatty acid) เช่น อะซิเตท โพรพิโอเนท บิวไทเรท และมีก๊าซ เช่น ไฮโดรเจน มีเทน และ คาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ยังมีผลผลิตอื่น เช่น แลคเตส ซึ่งผลจากการย่อยกาแลคโตโอลิโกแซคคาไรด์ โดยจุลินทรีย์จะมีผลไปกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และ Lactobacilli ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มนี้ช่วยในการสังเคราะห์วิตามิน กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ป้องกันการเกิดท้องเสีย

2.2.1.2 Fructo-oligosacchrides (FOS) และ Inulin

Inulin เป็นสารโพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharides) ที่พืชเก็บไว้เป็นอาหารซึ่งเป็นโมเลกุลขนาดเล็กอยู่ในกลุ่มฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์มีฟรุคโตส (Fructose) 3-60 โมเลกุล พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในพืช แบคทีเรียและราบางชนิด ซึ่งอินนูลินพบในผักและผลไม้มากกว่า 3,600 ชนิดโดยเฉพาะในผักตระกูล chicorium เช่น ชิคอรี (Chicory) นอกจากนี้ยังพบในกล้วย และพืชในตระกูลหอม เช่น หอมหัวใหญ่ กระเทียม เป็นต้น (Bxcommerce, 2001) อินนูลิน (Inulin) ไม่ถูกย่อยในลำไส้เล็ก แต่บางส่วนถูกย่อยในลำไส้ใหญ่โดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ใหญ่ อินนูลิน (Inulin) และ ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructo-oligosacchride) ละลายน้ำได้ดีโดยเฉพาะในน้ำร้อน (Tanya, 2002) อุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียส (Kim and Wang, 2002) แต่ละลายได้เพียง

เล็กน้อยในน้ำเย็น และแอลกอฮอล์ (Paul, 1997) และมีความคงตัวสูง ไม่มีผลข้างเคียงต่อระบบประสาทสัมผัส รสชาติหวานเล็กน้อย จึงมีการนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรมอาหารในลักษณะต่างๆ (Vicki, 2002) เช่น นำไปปรับปรุงในรสชาติและเนื้อสัมผัส ช่วยรักษาความสดและความชื้นในเค้ก ช่วยให้เครื่องดื่มละลายเข้ากันดี มีคุณสมบัติเชิงหน้าที่ (Functional property)

2.2.1.3 ซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ (Soybean oligosaccharide, SOS)

เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่มีอยู่ในถั่วเหลืองซึ่งเป็นกลุ่ม แรฟฟีโนส และ สตาคีโอส (Gibson, 2004) สามารถทนต่อการย่อยโดยเอนไซม์ในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก และเกิดการหมักโดยจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้ ซึ่ง Hayakawa และคณะ (1990) ได้ศึกษาการหมักซอยบีนโอลิโกแซคคาไรด์ (Soybean oligosaccharides) โดยเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้ใหญ่ พบว่าจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria มีการเจริญเพิ่มขึ้น

2.2.2 พรีไบโอติกที่ได้จากการสังเคราะห์

2.2.2.1 แลคโตซูโครส (Lactosucrose, LS)

แลคโตซูโครส ผลิตมาจากการรวมกันของแลคโตสและซูโครส โดยใช้เอนไซม์ β-fructofuronosidase และมีคุณสมบัติไปเสริมการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ซึ่ง Ohkusa และคณะ (1995) ได้ศึกษาผลของแลคโตซูโครสในอาสาสมัคร 3 คนโดยให้ LS ปริมาณ 3 กรัมต่อวัน พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้ 0.7 เท่า และลดปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteriodes* ได้ 0.6 เท่า นอกจากนี้กรดไขมันสายสั้น (short chain fatty acid) เช่น อะซิเตท และ บิวเทอเรส ยังมีปริมาณเพิ่มขึ้น

2.2.2.2 แลคทูโลส (Lactulose)

แลคทูโลส ผลิตจากน้ำตาลแลคโตสมีโครงสร้างอยู่ในรูป Gal β1-4 Fru มีคุณสมบัติละลายในน้ำ ละลายในเมทานอลได้เล็กน้อย และไม่ละลายในอีเทอร์ ซึ่งแลคทูโลส จะไม่ถูกย่อยดูดซึมในลำไส้เล็กแต่จะเกิดการหมักโดยแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ และมีผลให้จำนวนจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้เพิ่มขึ้น Terada และคณะ (1993) ศึกษาผลของแลคทูโลสต่อการเจริญของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่โดยให้แลคทูโลส 3 กรัมต่อวัน ในอาสาสมัคร 8 คน เป็นเวลา 14 วัน พบว่าจำนวนแบคทีเรียกลุ่ม Bifidobacteria เพิ่มขึ้น และแบคทีเรียที่ก่อโรค เช่น Clostridia, *Bacteriodes* และ Streptococci ลดลง นอกจากนี้ Ballongue และคณะ (1997) ได้ศึกษาโดยการให้แลคทูโลส 10 กรัมต่อวันในอาสาสมัคร 2 คนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม Lactobacilli เพิ่มขึ้น

2.2.2.3 ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Isomalto-oligosaccharide, IMO)

ไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์ ถูกเปลี่ยนมาจากแป้งโดยการใช้เอนไซม์บางส่วนจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ในลำไส้เล็ก คือไอโซมอลโตส (Kolida *et al*., 2000) Olano-Martin และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลของ IMO ต่อการเจริญของเชื้อโปรไบโอติกในลำไส้โดยทำการศึกษาในผู้ชาย 6 คนที่มีสุขภาพแข็งแรงโดยให้ IMO ปริมาณ 20 กรัมต่อวันพบว่าสามารถเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ซึ่งจากการศึกษาการหมักไอโซมอลโตโอลิโกแซคคาไรด์กับแบคทีเรียแลคติกพบว่าสามารถผลิตบิวเทอเรสได้

2.2.2.4 กลูโคโอลิโกแซคคาไรด์ (Gluco-oligosaccharides, GOS)

เป็นโอลิโกแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสมาต่อกันด้วยพันธะ β,1-6 glucosidic linkages สังเคราะห์ด้วยเอนไซม์ glucosyl-transferase ที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ *Leuconostoc mesenteroides* หรืออาจสกัดมาจาก β-glucan จากต้นโอ๊กและได้มีการยอมรับว่าเป็น functional food และ GOS ถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria ได้อย่างจำเพาะ ซึ่งการให้ GOS แก่หนูสามารถเสริมการเจริญของ *Bifidobaterium breve* และลดการปนเปื้อนของ Salmonella ได้ (Ashara *et al*., 2001)

2.2.2.5 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ (Xylo-oligosaccharides)

ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์ มีโครงสร้างหลักประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลไซโลสที่ต่อกันด้วยพันธะ β,1-4 ไซโลโอลิโกแซคคาไรด์จะถูกนำไปใช้โดยจุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria และ lactobacilli ได้อย่างจำเพาะ ซึ่งส่งผลให้จุลินทรีย์กลุ่ม Bifidobacteria เพิ่มขึ้นและจุลินทรีย์กลุ่ม *Bacteroides* ลดลง ได้มากกว่าการใช้ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Gibson and Angus, 2000; Gibson, 2004)

2.2.3 พรีไบโอติกจากธัญพืช

ธัญพืชที่สามารถตรวจพบสารพรีไบโอติก ได้แก่ ข้าว ถั่ว และข้าวโพด เป็นต้น ในถั่วนั้นนิยมนำมาบริโภคเนื่องจากมีสารอาหารสูง มีปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรตในระดับสูง เช่นเดียวกับ ข้าวโพดที่มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงประมาณ 72 เปอร์เซ็นต์ แต่มีโปรตีนประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งองค์ประกอบของคาร์โบไฮเดรตในถั่ว เช่นถั่วเหลือง ประกอบด้วยโอลิโกแซคคาไรด์ซึ่งเป็นโพลีแซคคาร์ไรด์สายสั้นๆ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 3-10 โมเลกุล เช่น ราฟฟิโนส โดยมีคุณสมบัติเฉพาะคือ ไม่สามารถถูกย่อยได้ด้วยน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร แต่จะถูกย่อยสลายได้โดยแบคทีเรียในลำไส้ โดยทั่วไปถั่วมีส่วนประกอบของสารอาหารที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีนประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ และคาร์โบไฮเดรต ประมาณ 50 – 60 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นถั่วเหลืองซึ่งจะมีโปรตีนสูงกว่าคาร์โบไฮเดรต คาร์โบไฮเดรตในถั่วประกอบด้วย raffinose, stacyose และ verbacose ซึ่งเป็น

คาร์ไบโอเดรตที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ โดยคาร์โบไฮเดรตในพืชตระกูลถั่วจัดอยู่ในกลุ่มราฟฟิโนส (Martinez-Villaluenga et al., 2005)

3. เส้นใยอาหาร (Dietary Fiber)

เส้นใยอาหารสามารถจัดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ดังแสดงใน Table 2. โดยกลุ่มแรกอธิบายในเรื่องของพฤกษศาสตร์ ซึ่งก็คือส่วนประกอบในผนังเซลล์ของพืช กลุ่มที่สองกล่าวถึงด้านเคมี กล่าวว่าเส้นใยอาหารก็คือ กลุ่มของ non-starch polysaccharides ส่วนกลุ่มสุดท้ายครอบคลุมถึงกลุ่มของโพลีแซคคาไรด์ทั้งหมดและลิกนินที่ทนต่อขบวนการย่อยในทางเดินอาหาร ซึ่งจากความหมายข้างต้นครอบคลุมถึงกลุ่มของ non-digestible oligosaccharides ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก โดยพืชหลายชนิดที่ให้เส้นใยได้แก่ ธัญพืชชนิดต่างๆ และรำข้าว ซึ่งจะให้ปริมาณเส้นใยอาหารที่แตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของพืช ดังแสดงใน Table 3.

Table 2. Different definitions of dietary fiber

Authors	**Polymers included in the definition**
Trowell, 1972	Cellulose, lignin, hemicellulose, peptins (skeletal remains of plants cells)
Trowell, 1974	Cell wall polysaccharides + lignin + unavailable associated
Trowell et al, 1976	substances (cutin, suberin and phytic acid)
	Unavailable storage polysaccharides + cell wall polysaccharides + lignin
Southgate et al, 1981	Non-starch polysaccharides + lignin
Cummings and Englyst, 1987	Non-starch polysaccharides

ที่มา : ดัดแปลงจาก Guillon และคณะ (2000)

Table 3. Comparison of total dietary fiber content in cereal grains

Cereals	Total dietary fibre (%, db)
Legumes	13.6-28.9
Rye	15.5
corn	15
Triticale	14.5
Oat	14
wheat	12
Sorghum	10.7
Barley	10
Finger millet	6.2-7.2
Rice	1.9±2

ที่มา : Charalampopoulod และคณะ (2000)

3.1 ประโยชน์ของเส้นใยอาหารที่สำคัญพอกล่าวได้ดังนี้

เส้นใยอาหารกับการลำเลียงในลำไส้ใหญ่

สำหรับผู้ที่มีปัญหาเรื่องระบบขับถ่ายสามารถแก้ไขได้ด้วยการบริโภคอาหารประเภทเส้นใย ทั้งเส้นใยชนิดที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ เช่น เส้นใยจากรำข้าวสาลีและเซลลูโลสซึ่งเป็นเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำแต่สามารถอุ้มน้ำได้ดี มีผลต่อการเพิ่มมวลของอุจจาระ ช่วยทำให้อุจจาระอ่อนนุ่มและเคลื่อนตัวได้เร็ว ลดระยะเวลาในการขับถ่าย เส้นใยจากธัญพืชจะมีผลต่อการเพิ่มมวลอุจจาระได้มากกว่าเส้นใยจากผลไม้ ส่วนเส้นใยประเภทละลายน้ำ เช่น แพคตินจะไม่มีผลต่อการขับถ่ายเพราะถูกย่อยโดยจุลินทรีย์ในลำไส้

เส้นใยอาหารกับโรคมะเร็ง

การศึกษาเกี่ยวกับการบริโภคอาหารที่มีเส้นใยและองค์ประกอบอื่น ๆ กับการเกิดมะเร็งในลำไส้ของสตรีที่มีอายุสูงกว่า 60 ปี ของ Willette และคณะ (1990) พบว่า การบริโภคเส้นใยจากผลไม้ช่วยลดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งมากกว่าเส้นใยจากแหล่งอื่น ๆ เช่น เส้นใยจากธัญพืช เส้นใยจากผัก โดยมีเหตุผลสนับสนุนว่าเส้นใยจากผลไม้มีสารอาหารที่ร่างกายต้องการในปริมาณเล็กน้อย (Micronutrients) ที่มีประโยชน์หลายชนิด เช่น วิตามินอี วิตามินซี และเบต้า-แคโรทีน ซึ่งสารเหล่านี้พบอยู่ร่วมกับเส้นใยอาหาร และเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน จึงช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งได้

เส้นใยอาหารกับกระบวนการเมทาบอลิซึมของร่างกาย

เส้นใยอาหารมีคุณสมบัติในการดูดซึมสารอาหารที่ละลายได้ในน้ำ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส (Glucose) ซึ่งเป็นสาเหตุของไขมันและภาวะเบาหวาน (Diabetes) จึงทำให้เราได้รับประโยชน์ในการควบคุมปริมาณสารอาหารน้ำตาล (Glucose) จากอาหารที่เรารับประทานได้ทั้งในผู้ป่วยเบาหวาน และผู้ที่มีปัญหาน้ำหนักตัวหรืออ้วน (Obesity) และสารอาหารบางอย่างถึงแม้ว่าไม่ละลายในน้ำ อย่างเช่นสารอาหารจำพวกไขมัน ก็ยังพบว่าเป็นสารอาหารที่สามารถถูกกำจัดและถูกขัดขวางการดูดซึมเข้าสู่ร่างกายโดยเส้นใยอาหารได้เช่นเดียวกัน โดยพบว่าเส้นใยอาหารจะห่อหุ้มสารอาหารจำพวกไขมันไว้กับกลุ่มของเส้นใยอาหาร ทำให้สารอาหารไขมันไม่สามารถแตกตัวเป็นโมเลกุลเล็ก ๆ หรือ กรดไขมัน (Fatty Acids) ที่จะสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย หลังจากที่เส้นใยอาหารดูดซับสารอาหารน้ำตาลและห่อหุ้มเอาสารอาหารจำพวกไขมันไว้กับตัวแล้ว เส้นใยอาหารก็จะถูกขับออกไปจากร่างกาย โดยทางอุจจาระอย่างง่ายดาย

เส้นใยอาหารมีผลต่อระบบเมทาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและการดูดซึมแร่ธาตุ โดยพบว่าเส้นใยที่ละลายน้ำและเส้นใยที่มีความหนืดสูงจะเป็นตัวช่วยลดระดับกลูโคสและคอเลสเตอรอลหลังรับประทานอาหารได้ดี ส่วนเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำมีผลต่อการยับยั้งการดูดซึมธาตุเหล็กและสังกะสีเนื่องจากเส้นใยมีองค์ประกอบของไฟเทต (Phytate) อยู่ด้วย ดังนั้นแนวทางแก้ปัญหาในส่วนนี้ทำได้โดยกำจัดไฟเทตออกจากเส้นใยอาหารในระหว่างกระบวนการแปรรูป ซึ่งจะช่วยให้ร่างกายมีการดูดซึมธาตุเหล็ก สังกะสี และแคลเซียมไปใช้ประโยชน์ได้มากขึ้น

4. ซินไบโอติก (Synbiotic)

ซินไบโอติก เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการรวมกันของแบคทีเรียโปรไบโอติกและสารพรีไบโอติก ซึ่งจะมีผลการส่งเสริมการเจริญและการรอดชีวิตของแบคทีเรียโปรไบโอติกในทางเดินอาหาร ซึ่งจะช่วยให้โปรไบโอติกในทางเดินอาหารมีการรอดชีวิตมากขึ้น เกิดการเกาะติดผนังลำไส้ และสามารถเกิดการหมักในลำไส้ใหญ่ได้ดีขึ้น ส่งผลให้สุขภาพของเซลล์เจ้าบ้านดีขึ้น (Tuohey *et al*., 2003) โดยพบว่าการให้หนูรับประทานผลิตภัณฑ์ซินไบโอติกที่มีการผสมสารพรีไบโอติกชนิดโอลิโกฟรุคโตส 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ Bifidobacteria ที่มีชีวิตปริมาณ 10^9 เซลล์ เปรียบเทียบกับหนูที่กินอาหารปกติ และหนูที่มีการกินแบคทีเรียโปรไบโอติกเป็นเวลา 14 วัน พบว่าหนูที่กินผลิตภัณฑ์ซินไบโอติกสามารถเพิ่มจำนวนของ Bifidobacteria ประมาณ 1.4 Log CFU ต่อกรัมอุจจาระ เมื่อเปรียบเทียบกับการให้หนูกินแต่ Bifidobacteria เพียงอย่างเดียวที่มีการเพิ่มขึ้นแค่ 0.6 Log CFU ต่อกรัมอุจจาระ (Bielecka *et al*, 2002) นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ซินไบโอติกมีผลต่อการลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งลำไส้ โดยสามารถลดการพัฒนาของเซลล์ที่สามารถเกิดโรคมะเร็ง

ลำไส้ใหญ่ เมื่อให้อินนูลินหรือโอลิโกฟรุคโตสประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของอาหารที่บริโภคพร้อมกับการให้แบคทีเรียโปรไบโอติก คือ *Bifidobacterium longum* (Reddy, 1999)

5. การประยุกต์ใช้สารพรีไบโอติกในการเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติก

จำนวนของโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆมีปริมาณที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปริมาณของโปรไบโอติกที่เติมลงไปก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตหรือหลังกระบวนการผลิตก็ตาม ดังนั้น จำนวนโปรไบโอติกมีชีวิตที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์นั้นมีความสำคัญมาก ซึ่งต้องมีจำนวนโปรไบโอติกที่มีชีวิตในผลิตภัณฑ์อย่างน้อย 10^6 CFU/มล. โดยการรอดชีวิตของโปรไบโอติกเริ่มตั้งแต่กระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ และเมื่อผ่านสภาวะทางเดินอาหารส่วนต้นของมนุษย์ ซึ่งมีทั้งสภาวะที่เป็นกรดสูงในกระเพาะอาหาร และสภาวะที่มีเกลือน้ำดีของลำไส้เล็ก ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลทำให้การรอดชีวิตของโปรไบโอติกลดลง ร่างกายจึงได้รับจุลินทรีย์เหล่านี้ในปริมาณที่น้อย ดังนั้นการใช้สารพรีไบโอติก ซึ่งมีความทนต่อการย่อยและดูดซึมในทางเดินอาหารส่วนต้น นอกจากจะช่วยในการเพิ่มจำนวนโปรไบโอติกในลำไส้ใหญ่แล้วยังช่วยเสริมการรอดชีวิตของโปรไบโอติกจากสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่างๆตั้งแต่ขั้นตอนการแปรรูป การเก็บรักษาและการเข้าสู่ร่างกายของผู้บริโภค โดยพบว่าการใช้สารสกัดจากธัญพืช ได้แก่ ข้าวมอลต์และบาร์เล่ย์ เป็นตัวตรึงเซลล์เพื่อเป็นตัวนำโปรไบโอติกผ่านทางเดินอาหารส่วนต้นที่มีทั้งกรดและเกลือน้ำดีไปสู่ลำไส้ใหญ่ เพื่อให้มีโปรไบโอติกที่มีชีวิตมากที่สุด โดย free cell ของ *Lactobacillus plantarum* เมื่อผ่านสภาวะที่เสมือนน้ำย่อยในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 30 นาที ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มี 7.24 log CFU/มล. จะลดลงเหลือ 1.92 log CFU/มล. แต่เมื่อตรึงเซลล์ด้วย barley fiber และผ่านสภาวะเดียวกันที่เวลา 30 นาทีปรากฏว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มี 7.24 log CFU/มล. จะลดลงเหลือ 5.1 log CFU/มล นอกจากนี้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 4.5 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 4 ชั่วโมง free cell ของ *Lactobacillus plantarum* ไม่ได้เพิ่มมากขึ้นหรือลดจำนวนลง ส่วนเซลล์ที่ถูกตรึงด้วย malt fiber ในสภาวะเดียวกันที่เวลา 240 นาที ปรากฏว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มี 7.59 log CFU/มล. เพิ่มขึ้นเป็น 7.72 log CFU/มล. (Michida *et al*., 2006)

พรีไบโอติกเป็นสารอาหารกลุ่มโอลิโกแซคคาร์ไรด์ที่พบได้ทั้งในผัก ผลไม้ และธัญพืช ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และมีความจำเพาะต่อการส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติกในลำไส้ใหญ่ ซึ่งการประยุกต์ใช้พรีไบโอติกเพื่อเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติก สามารถนำไปใช้ได้ในหลายขั้นตอน ตั้งแต่ การเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นขั้นตอนเริ่มแรกในการผลิตเซลล์โปรไบโอติก จากคุณสมบัติของพรีไบโอติกที่สามารถส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติกนั้น มีการนำสารพรีไบโอติกมาเป็นแหล่งอาหารของโปรไบโอติก โดย

พบว่า การใช้สารพรีไบโอติก 4 ชนิด ได้แก่ Hi-maize starch, Lactulose, Raftilose และ Inulin ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนในนมพร่องมันเนยที่ใช้ในการเลี้ยง *Bifidobacterium* 5 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *Bifidobacterium* ที่เลี้ยงในอาหารที่มี Hi-maize starch เป็นองค์ประกอบมีการเจริญดีที่สุด และเมื่อนำมาเก็บรักษาที่ห้องเย็นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการวัดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* ที่สัปดาห์ที่4 พบว่า *Bifidobaterium infantis* (Bb-1) และ *Bifidobaterium pseudolongum* (Bb-4) มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 56.22 ± 0.1 และ 45.37 ± 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อใช้ Raftilose เป็นแหล่งคาร์บอน และการใช้ Hi-maize starch เป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ *Bifidobaterium longum* (Bb-2), *Bifidobacterium longum* (Bb-3). และ *Bifidobaterium animalis* (Bb-5) มีการรอดชีวิต 51.17 ± 0.3, 75.32 ± 0.1และ 75.34 ± 0.1เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเฉลี่ยแล้วการรอดชีวิตของ *Bifidobacterium* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยสูงสุดเมื่อใช้ Hi-maize starch เป็นแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 58.00 ± 0.2 เปอร์เซ็นต์ (Bruno *et al*., 2002) แต่การศึกษาของ Capela และคณะ (2006) ที่มีการใช้พรีไบโอติก 3 ชนิด ได้แก่ Fructo-oligosaccharide (FOS), Inulin และ Hi-maize ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ เติมผสมลงในโยเกิร์ตที่เติมโปรไบโอติก (*Lactobacillus acidophilus* 33200, *Lactobacillus casei* 279, *Bifidobaterium longum* 536 and *Lactobacillus rhamnosus*) แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วตรวจการรอดชีวิตทุก 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ พบว่า FOS มีประสิทธิภาพในการเสริมการรอดชีวิตของโปรไบโอติกมากที่สุด

จากทั้งสองการทดลองใช้สารพรีไบโอติกเป็นแหล่งคาร์บอนเหมือนกัน และมีสารพรีไบโอติกบางชนิดเหมือนกัน แต่เมื่อนำมาใช้กับโปรไบโอติก และสภาวะอาหารที่ต่างกัน ก็ทำให้คุณสมบัติในการเสริมการรอดชีวิตของโปรไบโอติกต่างกัน ในการทดลองแรก Hi-maize starch สามารถส่งเสริมการรอดชีวิตได้ดีที่สุด แต่ในการทดลองที่สองก็มีการใช้ Hi-maize starch เหมือนกัน แต่สารพรีไบโอติกที่ส่งเสริมการรอดชีวิตของโปรไบโอติกมากที่สุด คือ Fructo-oligosaccharide (FOS) ดังนั้นการใช้สารพรีไบโอติกเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ของโปรไบโอติก

6. การทำแห้งโปรไบโอติก

การทำแห้งหมายถึง กระบวนการที่ความร้อนถูกถ่ายเทด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งไปยังวัตถุที่มีความชื้น เพื่อไล่ความชื้นในวัตถุนั้น ๆ ให้ออกไป โดยในขณะที่อากาศอบแห้งไหลผ่านวัตถุ การถ่ายเทความร้อนและมวลของน้ำจะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กัน ความร้อนจะเกิดการถ่ายเทจากอากาศที่อบแห้งไปยังผิวของวัตถุที่เย็นกว่าทำให้น้ำที่ผิวของวัตถุระเหยและถ่ายเทไปยังอากาศที่ไหลผ่านทำ

ให้ผลิตภัณฑ์มีความชื้นลดลง (วาสนา กิตติกนกรัตน์, 2546) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค และวิธีการทำแห้งแบบต่าง ๆเข้ามาช่วยในการทำแห้งผลิตภัณฑ์

การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) ทำโดยการแช่แข็งเชื้อจุลินทรีย์ก่อน แล้วจึงนำไปทำให้แห้งด้วยการระเหิดที่อุณหภูมิและความดันต่ำ (สุญญากาศ) วิธีการนี้เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ที่ไม่สามารถทำให้แห้งได้ด้วยความร้อน หรือ เสื่อมเสียได้ง่าย (Gardiner *et al*., 2002)

การอบแห้งแบบฟลูอิดไดซ์เบด (fluidized-bed drying) เป็นการอบแห้ง โดยการใช้อากาศร้อนป้อนเข้าทางตอนล่างของตะแกรง ทำให้อนุภาคของแข็งที่ต้องการอบแขวนลอยในอากาศร้อน

การอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray drying) ทำโดยการพ่นของเหลวที่มีความเข้มข้น 10-20 เปอร์เซ็นต์ (wet basis) ผ่านหัวฉีด (atommizer) ให้กระจายเป็นอนุภาคที่ละเอียดเข้าไปในอากาศร้อน เกิดการถ่ายเทความร้อนระหว่างผลิตภัณฑ์กับอากาศร้อน เกิดการระเหย ทำให้ผลิตภัณฑ์จากของเหลวเปลี่ยนเป็นรูปผง

การอบแห้งแบบถาดอยู่กับที่ (fixed-tray drying) โดยเครื่องอบแห้งแบบถาดอยู่กับที่นี้ วัสดุที่ต้องการอบแห้งจะบรรจุอยู่ในถาดซึ่งวางซ้อนกันโดยมีช่องว่างของอากาศระหว่างถาด ปริมาณความชื้นเริ่มต้นของวัสดุไม่ควรสูงมากนัก (ควรต่ำกว่า 24 เปอร์เซ็นต์) โดยเครื่องอบแห้งแบบนี้จะทำให้วัสดุแห้งโดยการให้ลมร้อนไหลผ่านวัสดุที่บรรจุอยู่ในถาด

ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกในรูปผงแห้งมีข้อดีคือ มีอายุการเก็บรักษานาน การขนส่งสะดวกซึ่งการทำแห้งจะทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์หยุดลง และเป็นการป้องกันการงอกของสปอร์ด้วย การที่จุลินทรีย์จะมีความสามารถในการทนต่อความแห้งได้นั้นจะแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ วัสดุตัวกลางที่ห่อหุ้มจุลินทรีย์ โดยถ้าสามารถเลือกวิธีการทำแห้งที่ถูกวิธีจะทำให้สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตที่สูง และมีอายุการเก็บรักษาที่นานขึ้นได้

7. การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze-drying)

กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze Drying) หรือการทำแห้งแบบระเหิด (Sublimation Drying) มีชื่อเรียกเฉพาะว่า “ Lyophilization” เป็นกระบวนการทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำ จึงช่วยให้ผลิตภัณฑ์คงคุณค่าทางโภชนาการ เนื้อสัมผัส โครงสร้าง สี กลิ่น และรสชาติ ใกล้เคียงกับของสด โดยหลักการพื้นฐานของกระบวนการทำแห้งชนิดต่างๆสามารถอธิบายได้จากแผนภูมิสถานะ (Phase diagram) ของน้ำบริสุทธิ์ (Figure 1.) จุด A ที่อุณหภูมิและความดันบรรยากาศปกติ (30 องศาเซลเซียส และ 105 ปาสคาล) น้ำอยู่ในสถานะของเหลว การทำ

แห้งโดยทั่วไป (Convention Drying) จะให้พลังงานความร้อนกับผลิตภัณฑ์ จนถึงระดับความร้อนแฝงของการระเหยน้ำ (Latent Heat of Evaporation) น้ำภายในผลิตภัณฑ์ระเหยเปลี่ยนสถานะเป็นไอที่จุด B แต่การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์จนถึงจุดเยือกแข็ง C หรือจุด D ซึ่งต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง เพื่อให้น้ำภายในผลิตภัณฑ์สร้างผลึกเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งได้อย่างสมบูรณ์ จากนั้นลดความดันสุญญากาศจนถึงจุดต่ำกว่าจุด E หรือเส้นขอบเขตของการเปลี่ยนสถานะ เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งภายในผลิตภัณฑ์เกิดการระเหิดเปลี่ยนสถานะกลายเป็นไอได้อย่างสมบูรณ์ (ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล, 2547)

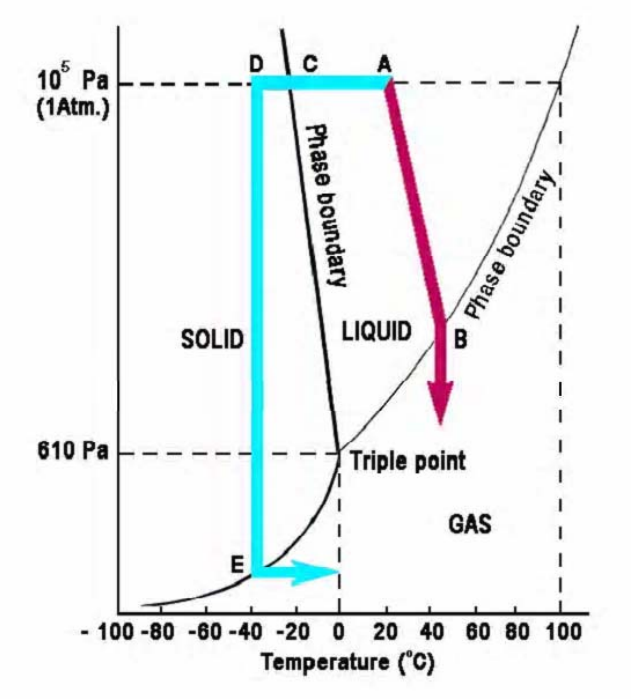


Figure 1. Water phase diagram

ที่มา : ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล (2547)

กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน คือ การแช่เยือกแข็ง (Freezing) การทำแห้งระยะที่ 1 (Primary Drying) และการทำแห้งระยะที่ 2 (Secondary Drying) ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

การแช่เยือกแข็ง (Freezing) ในขั้นตอนนี้เป็นการลดอุณหภูมิของผลิตภัณฑ์ลงจนถึงจุดเยือกแข็งหรือต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ให้น้ำหรือสารละลายเปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งได้อย่างสมบูรณ์ สิ่งสำคัญของขั้นตอนนี้ คือ การเกิดผลึกน้ำแข็ง ระดับความเร็วของการแช่เยือกแข็งควรเป็นการแช่แบบเร็ว (Quick freezing) เนื่องจากผลึกที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็ก ซึ่งเกิดจากน้ำที่อยู่ภายใน

ช่องว่างระหว่างเซลล์แข็งตัวอย่างรวดเร็ว ลักษณะของผลึกเช่นนี้ ไม่ทำให้โครงสร้างของผลิตภัณฑ์เสียหาย แต่หากเป็นการแช่เยือกแข็งแบบช้า (Natural freezing) เวลาในการเกิดผลึกนาน ทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดใหญ่ เบียดช่องว่างระหว่างเซลล์ทำให้เซลล์แตก โครงสร้างของผลิตภัณฑ์ได้รับความเสียหาย การแช่เยือกแข็งแบบเร็วที่นิยมใช้กันมีหลายวิธี เช่น การแช่แข็งแบบลมเป่า การแช่เยือกแข็งแบบสัมผัส และการแช่เยือกแข็งแบบจุ่มในของเหลวเย็นจัด เป็นต้น

การทำแห้งระยะที่ 1 (Primary drying) ขั้นตอนนี้เป็นการลดความดันลง เพื่อให้ผลึกน้ำแข็งที่อยู่ภายในเกิดการระเหิดเป็นไอ ออกไปจากผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ ระดับของความดันสุญญากาศควรอยู่ในระดับสุญญากาศละเอียด (Fine Vacuum) ถึงระดับสุญญากาศสูง (High vacuum) ซึ่งมีความดันต่ำกว่า 132 ปาสคาล และ 132 mPa ตามลำดับ การระเหิดของผลึกน้ำแข็งจึงเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ การระเหิดของผลึกน้ำแข็งระหว่างการทำแห้งระยะที่ 1 (Figure 2.) แหล่งความร้อนถ่ายเทความร้อนแฝงในการระเหิดกับผลิตภัณฑ์ โดยมีลำดับของการระหิด ดังนี้

- การระเหิดของชั้นน้ำแข็ง (Ice Layer) บริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์
- ชั้นน้ำแข็งที่ระเหิดไป กลายเป็นชั้นแห้ง (Dry Layer) อยู่บริเวณผิวหน้าของผลิตภัณฑ์
- ชั้นน้ำแข็งที่อยู่ภายในผลิตภัณฑ์ ระเหิดผ่านชั้นแห้งออกไปสู่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์

ทั้งนี้เวลาการระเหิด (Sublimation Time) ขึ้นอยู่กับโครงสร้างของผลิตภัณฑ์แต่ละชนิดว่าโครงสร้างเซลล์โปร่งหรือแน่นเพียงใด

การทำแห้งระยะที่ 2 (Secondary Drying) ในขั้นตอนนี้เป็นการกำจัดน้ำที่อยู่ในรูปของพันธะกับสารอื่น (Bound water) ในผลิตภัณฑ์ ซึ่งไม่ตกผลึกและแข็งตัวไปกับน้ำอิสระ ช่วงการทำแห้งนี้ เรียกว่า “Desorption” จาก Figure 2. ช่วงของการ Desorption อุณหภูมิของผลิตภัณฑ์เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากการถ่ายเทความร้อนแฝงให้ชั้นน้ำแข็งหมดไป พลังงานจากแหล่งความร้อนจึงถ่ายเทสู่ผลิตภัณฑ์โดยตรง

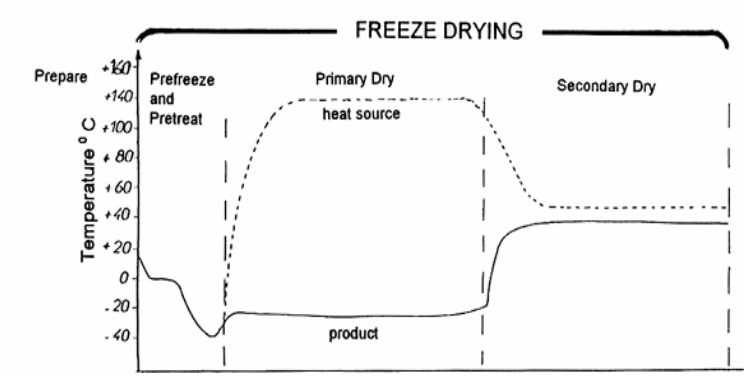


Figure 2. Freeze drying process

ที่มา : ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล (2547)

8. ปัจจัยที่มีผลต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในรูปผลิตภัณฑ์

การรอดชีวิตและกิจกรรมของโปรไบโอติกมีความสำคัญมาก เนื่องจากโปรไบโอติกต้องรอดชีวิตอยู่ในผลิตภัณฑ์ระหว่างการเก็บรักษาและมีจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตน้อยที่สุด 10^6 CFU/มล. เพื่อเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย นอกจากนี้ต้องรอดชีวิตเมื่อผ่านสภาวะที่เป็นกรดของกระเพาะอาหารและต้องทนต่อการทำลายของเอนไซม์และเกลือน้ำดีในลำไส้เล็ก ซึ่งมีปัจจัยหลายด้านด้วยกันที่มีบทบาทต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติก โดยสามารถสรุปได้ ดังนี้

1. สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ การใช้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่รุนแรงได้ จะทำให้อัตราการรอดชีวิตของจุลินทรีย์เมื่อผ่านกระบวนการผลิตต่างๆมีจำนวนมาก ทำให้ผู้บริโภคได้รับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์สู่ร่างกายในปริมาณที่เพียงพอ จากการทดลองของ To และ Etzel (1997) ได้ศึกษาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเชื้อ 3 ชนิด คือ *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* D11, *Lactobacillus casei* ssp. *pseudo-plantarum* UL137 และ *Streptococcus thermophilus* CH3TH โดยใช้ Maltodextrin 30 เปอร์เซ็นต์ เป็นสารป้องกันเซลล์ และพบว่า *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* D11, *Lactobacillus casei* ssp. *pseudo-plantarum* UL137 และ *Streptococcus thermophilus* CH3TH มีอัตราการรอดชีวิตของเชื้ออยู่ที่ 63, 71 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ Capela และคณะ (2006) ซึ่งศึกษาการรอดชีวิตของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium longum* ภายหลังจากทำการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่า *Bifidobacterium longum* มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่า *Lactobacillus acidophilus* แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งการรอดชีวิตของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ (Carvalho *et al*., 2004)

2. องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบของอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้จุลินทรีย์นั้นสามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว โดย Bruno และ Shah (2002) นำสารพรีไบโอติกมาเป็นแหล่งอาหารของโปรไบโอติก โดยพบว่า การใช้สารพรีไบโอติก 4 ชนิด ได้แก่ Hi-maize starch, Lactulose, Raftilose และ Inulin ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอนในนมพร่องมันเนยที่ใช้ในการเลี้ยง *Bifidobacterium* 5 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *Bifidobacterium* ที่เลี้ยงในอาหารที่มี Hi-maize starch เป็นองค์ประกอบมีการเจริญดีที่สุด และเมื่อนำมาเก็บรักษาที่ห้องเย็นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการวัดเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ *Bifidobacterium* ที่สัปดาห์ที่4 พบว่า *Bifidobacterium infantis* (Bb-1) และ *Bifidobacterium pseudolongum* (Bb-4) มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด 56.22 $\pm$ 0.1 และ 45.37 $\pm$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อใช้ Raftilose เป็นแหล่งคาร์บอน และการใช้ Hi-maize starch เป็นแหล่งคาร์บอนทำให้ *Bifidobacterium longum* (Bb-2), *Bifidobacterium longum* (Bb-3). และ *Bifidobacterium animalis* (Bb-5) มีการรอดชีวิต 51.17 $\pm$ 0.3, 75.32 $\pm$ 0.1และ 75.34 $\pm$ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยเฉลี่ยแล้วการรอดชีวิตของ *Bifidobacterium* ทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 4 สัปดาห์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเฉลี่ยสูงสุดเมื่อใช้ Hi-maize starch เป็นแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 58.00 $\pm$ 0.2 เปอร์เซ็นต์

3. พีเอช พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต่างกันก็ส่งผลให้เชื้อนั้นมีการรอดชีวิตหลังจากการทำแห้งที่แตกต่างกัน Palmfeldt และ Hgerdal (2000) ทำการเลี้ยง *Lactobacillus reuteri* ที่พีเอช 5.0 และ 6.0 แล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์เปรียบเทียบกับก่อนทำแห้ง พบว่าที่พีเอช 5.0 เซลล์มีการรอดชีวิตประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าที่พีเอช 6.0 ซึ่งรอดชีวิตประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะที่เป็นกรด โปรไบโอติก เช่น *Lactobacillus acidophilus* รอดชีวิตดีกว่า *Lactobacillus delbrueckii* spp. และ *Steptococcos thermophilus* ในโยเกิร์ต Hood และ Zottola (1988) พบว่า *Lactobacillus acidophilus* (BG2f04) มีการลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วที่พีเอช 2.0 แต่ที่พีเอช 4.0 ไม่พบการลดลงของเซลล์ที่มีชีวิต เหตุผลนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lankaputhra และคณะ (1996) ซึ่งศึกษา *Lactobacillus acidophilus* 6 สายพันธุ์ ซึ่งรอดชีวิตดีที่พีเอช 3.0 หรือมากกว่า และจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต มากกว่า 10^7 CFU/กรัม หลังจากบ่ม 3 ชั่วโมง แต่ *Lactobacillus acidophilus* มีความทนต่อสภาวะที่เป็นกรดมากกว่า *Bifidobacterium bifidum* และการเจริญของ *Bifidobacterium bifidum* จะช้าลงที่พีเอชประมาณ 5.0 แต่อย่างไรก็ตามการทนทานต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารของ *Bifidobacterium* นั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

4. อุณหภูมิที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงของเชื้อแต่ละชนิดจะไม่เหมือนกัน ขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง พบว่า *Lactobacillus* มีช่วงอุณหภูมิในการเจริญ 2-53 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส

5. ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเชื้อ การเจริญของแบคทีเรียมี 4 ระยะ คือ log, lag, stationary และ death phase ซึ่งที่ระยะ stationary phase เป็นระยะที่การเจริญของแบคทีเรียที่คงที่ โดยระยะที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตระหว่างการทำแห้งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ Corcoran และคณะ (2004) พบว่าที่ระยะ stationary phase เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* มีการรอดชีวิตหลังการทำแห้ง 31-50 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ระยะ log phase มีการรอดชีวิต 14 เปอร์เซ็นต์ และที่ระยะ lag phase เซลล์รอดชีวิตน้อยที่สุด 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับ Mary และคณะ (1986) ซึ่งพบว่า Rhizobia มีการรอดชีวิตสูงสุดที่ระยะ stationary phase และมีการรอดชีวิตของ *Sinorhizobium* และ *Bradyrhizobium* ที่เก็บตัวอย่างจากระยะ stationary phase มาทำแห้ง มีการรอดชีวิตสูงกว่าตัวอย่างที่เก็บจากระยะ log phase (Boumahdi *et al*., 1999)

6. สาร cryoprotectant คือ วัสดุหรือตัวกลางเพื่อป้องกันการบาดเจ็บหรือการทำลายจากสภาวะแวดล้อมภายนอก สาร cryoprotectant ก็มีด้วยกันหลายชนิด ที่นิยมใช้ได้แก่ นมพร่องมันเนยคืนรูป (reconstituted skim milk) ซูโครส เป็นต้น ซึ่งการเลือกใช้วัสดุหรือตัวกลางเพื่อป้องกันจุลินทรีย์อย่างเหมาะสมจะทำให้โปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตที่สูง Saarela และคณะ (2006) ที่ศึกษาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* E800 และ *Lactobacillus rhamnosus* E522 โดยใช้ไฟเบอร์ของแอปเปิ้ล ข้าวโอ๊ตที่มีส่วนประกอบของ β-glucan 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ wheat dextrin, polydextrose และ อินนูลิน เป็นสาร cryoprotectant ในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เปรียบเทียบกับการใช้ ซูโครสเป็น cryoprotectant พบว่า *Lactobacillus rhamnosus* ทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลการรอดชีวิตที่ใกล้เคียงกัน โดยการใช้ cryoprotectant ที่เป็น wheat dextrin และ polydextrose มีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกับการใช้ซูโครสเป็น cryoprotectant แต่สูงกว่าการใช้พรีไบโอติกชนิดอื่นเป็น cryoprotectant หลังจากผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง นอกจากนี้ Sultana และคณะ (2000) ได้ศึกษาการห่อหุ้มแบคทีเรียโปรไบโอติก ด้วยอัลจีเนตร่วมกับแป้งข้าวโพด ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก แล้วเติมลงในโยเกิร์ต หลังจากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าจำนวนแบคทีเรียโปรไบโอติกในรูปเซลล์อิสระจะมีลดลงประมาณ 1 log cycle ในขณะที่เซลล์แบคทีเรียโปรไบโอติกที่มีการห่อหุ้มมีจำนวนลดลงประมาณ 0.5 log cycle

7. อุณหภูมิและภาชนะบรรจุผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษา การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิต่ำจะช่วยเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานขึ้น และภาชนะที่ใช้บรรจุผลิตภัณฑ์ มีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของผลิตภัณฑ์ โดยต้องไม่มีการแพร่ผ่านของออกซิเจนและความชื้น Dave และ Shah (1997) พบว่าการบรรจุโยเกิร์ตในขวดแก้วจะปรับปรุงการรอดชีวิตของ *Lactobacillus acidophilus* มากกว่า 35 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับ *Lactobacillus acidophilus* ที่รอดชีวิตในโยเกิร์ตที่บรรจุในถ้วยพลาสติก ปริมาณออกซิเจนที่อยู่ในขวดแก้วจะต่ำ แต่ในขณะที่โยเกิร์ตในถ้วยพลาสติกจะมีการเพิ่มขึ้นของออกซิเจน โดยปริมาณออกซิเจนที่ต่ำจะทำให้การรอดชีวิตของโปรไบโอติกดีขึ้น

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกโปรไบโอติกที่เหลือรอดจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งได้สูงสุด
2. ผลของสารอาหารและการใช้สารพรีไบโอติกต่อการรอดชีวิตจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของโปรไบโอติก
3. ผลของสภาวะการเลี้ยงเชื้อ, อุณหภูมิ และพีเอชต่อการรอดชีวิตจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง
4. การรอดชีวิตในสภาวะจำลองทางเดินอาหารส่วนต้นในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กของโปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง
5. การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในเครื่องดื่มประเภทต่างๆ
6. ศึกษาผลของอุณหภูมิและประเภทภาชนะบรรจุในการเก็บรักษาต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

1. วิธีดำเนินการ

1.1 การเตรียมสารสกัดที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก

1.1.1 การเตรียมสารสกัดจากธัญพืช

นำธัญพืชแต่ละชนิด (ข้าวโพดที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง) มาบดและชั่งน้ำหนัก 5 กรัม สกัดด้วยน้ำ 95 มล. ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เขย่าหรือกวนเป็นเวลา 30 นาที นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดธัญพืช (cereal extract) และส่วนตะกอนซึ่งเป็นเส้นใยที่ไม่ละลายน้ำ (crude fiber) นำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying) รายงานผลได้ของสารสกัดจากธัญพืชในรูปน้ำหนักแห้ง ของสารสกัดธัญพืช (กรัม) / น้ำหนักแห้งเริ่มต้นของธัญพืช (กรัม) เก็บในขวดแก้วปิดสนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตลอดการทดลอง นำตัวอย่างสารสกัดไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดตามวิธีการในภาคผนวก ข

1.1.2 การเตรียมสาร Exopolysaccharides (EPSs) จากแบคทีเรียแลกติก

เลี้ยงแบคทีเรีย *Weissella cibaria* A2 ในอาหาร MRS โดยใช้ปริมาตร 200 มล. ในฟลาก์ส ขนาด 500 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงบนอาหาร MRS แล้วนำไปเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แยกตัวเซลล์ออกโดยนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสมาตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วย 95 เปอร์เซ็นต์ของเอทานอล ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรของสารละลาย และนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทำการล้างโดยนำตะกอนที่ได้มาละลายน้ำและทำการหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างเช่นเดิมซ้ำอีกครั้งเพื่อเป็นการกำจัดสารเจือปนอื่นที่ไม่ใช่ EPSs ที่ต้องการ จากนั้นนำมาไว้ในโถดูดความชื้นจนแห้ง รายงานผลได้ของ EPSs ที่ผลิตได้ในรูปน้ำหนักแห้งของ EPSs (กรัม) / ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (มล.) เก็บ EPSs ที่ได้ในขวดแก้วปิดสนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ตลอดการทดลอง (นันทินา เชิญทอง, 2550) นำตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาล ทั้งหมดตามวิธีการในภาคผนวก ข

1.2 ผลของสายพันธุ์และสภาวะในการแช่แข็งต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในระหว่างการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying)

นำ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034, *Bifidobacterium longum* DSM 20215 และ *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 จาก glycerol stock ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร ทำการเหวี่ยงแยกตัวเซลล์ที่ 10000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ตัวเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ถูกเจือจางด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรของนมพร่องมันเนยคืนรูป (reconstituted skim milk) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน นับจำนวนเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ภาคผนวก ข) แล้วจึงเก็บตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปทำการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20, -80 และ -196(ไนโตรเจนเหลว) องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ผลิตภัณฑ์ที่ได้อยู่ในรูปผง ทำการนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ภาคผนวก ข) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีการรอดชีวิตสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 ผลของสภาวะในการเลี้ยงโปรไบโอติกต่อการรอดชีวิตในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying)

1.3.1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติก

นำ *L. plantarum* จาก glycerol stock ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางความเข้มข้นและถ่ายเชื้อลงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยการคิดคำนวณค่า total sugar ของสารสกัด ให้มีค่าเท่ากับ 1000 มก./ก ของน้ำตาลกลูโคส) Fructo-oligosacchrides (FOS), น้ำตาลซูโครส, น้ำตาลกลูโคส, สารสกัดถั่วเหลือง, สารสกัดข้าวโพด, สารสกัดถั่วเขียว ที่เตรียมได้จากข้อ 1.1.1 และไม่เติมแหล่งคาร์บอนเป็นชุดควบคุม เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/มล. ทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม

bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหาร MRS agar จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร ทำการเหวี่ยงแยกตัวเซลล์ที่ 10000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ตัวเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ถูกเจือจางด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรของนมพร่องมันเนยคืนรูป (reconstituted skim milk) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน นับจำนวนเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วจึงเก็บตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปทำการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วจึงนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ผลิตภัณฑ์ที่ได้อยู่ในรูปผง ทำการนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ภาคผนวก ข) คัดเลือกแหล่งคาร์บอนที่ให้ผลการรอดชีวิตของ *L. plantarum* สูงที่สุด เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3.2 ผลของ Crude fiber ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติก

นำ *L. plantarum* จาก glycerol stock ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางความเข้มข้นและถ่ายเชื้อลงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์จากสารสกัดถั่วเหลือง และมีปริมาณ Crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ จาก ถั่วเหลือง ข้าวโพด ถั่วเขียวA (ส่วนตะกอนที่หยาบ) ถั่วเขียวB (ส่วนตะกอนที่ละเอียด) และ EPSs ที่เตรียมจากข้อ 1.1.1 และ 1.1.2 ตามลำดับโดยมีชุดที่ไม่เติม Crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุม เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้น10^5 CFU/มล. ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหาร MRS agar จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร ทำการเหวี่ยงแยกตัวเซลล์ที่ 10000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ตัวเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ถูกเจือจางด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรของนมพร่องมันเนยคืนรูป (reconstituted skim milk) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน นับจำนวนเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วจึงเก็บตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปทำการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วจึงนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ทำการนับจำนวนเชื้อที่

รอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ภาคผนวก ข) คัดเลือก crude fiber ที่ให้ผลการรอดชีวิตของ *L. plantarum* สูงที่สุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3.3 ผลของพีเอชต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติก

นำ *L. plantarum* จาก glycerol stock ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางความเข้มข้นและถ่ายเชื้อลงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์จากสารสกัดถั่วเหลือง และมีปริมาณ Crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ จากถั่วเขียวB (ส่วนตะกอนที่ละเอียด) ทำการปรับพีเอชของอาหาร เป็น 4, 5 และ 7 โดยชุดควบคุมเป็นพีเอชของอาหาร MRS ปกติ ซึ่งเท่ากับ 6.5เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้น10^5 CFU/มล. ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหาร MRS agar จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร ทำการเหวี่ยงแยกตัวเซลล์ที่ 10000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ตัวเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ถูกเจือจางด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรของนมพร่องมันเนยคืนรูป (reconstituted skim milk) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน นับจำนวนเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วจึงเก็บตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปทำการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วจึงนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ทำการนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ภาคผนวก ข) คัดเลือกผลของพีเอชที่ให้ผลการรอดชีวิตของโปรไบโอติกสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3.4 ผลของอุณหภูมิต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติก

นำ *L. plantarum* จาก glycerol stock ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางความเข้มข้นและถ่ายเชื้อลงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์จากสารสกัดถั่วเหลือง และมีปริมาณ Crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ จากถั่วเขียวB (ส่วนตะกอนที่ละเอียด) ปรับพีเอชของอาหาร เป็น 6.5 เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้น10^5 CFU/มล. ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 37 และ

45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหาร MRS agar จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง เมื่อครบ 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร ทำการเหวี่ยงแยกตัวเซลล์ที่ 10000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ตัวเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ถูกเจือจางด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรของนมพร่องมันเนยคืนรูป (reconstituted skim milk) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน นับจำนวนเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วจึงเก็บตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปทำการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วจึงนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ทำการนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ภาคผนวก ข) คัดเลือกผลของอุณหภูมิที่ให้ผลการรอดชีวิตของโปรไบโอติกสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.4 ผลของระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเซลล์ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกใน กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying)

1.4.1 ศึกษาการเจริญของโปรไบโอติกในสภาวะที่เหมาะสม

นำ *L. plantarum* จาก glycerol stock ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางความเข้มข้นและถ่ายเชื้อลงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์จากสารสกัดถั่วเหลือง และมีปริมาณ Crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ จากถั่วเขียวB (ส่วนตะกอนที่ละเอียด) ปรับพีเอชของอาหาร เป็น 6.5 เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้น10^5 CFU/มล. ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาการเจริญโดยนับจำนวนจุลินทรีย์ ด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์(นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหาร MRS agar จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง และวัดพีเอชที่เปลี่ยนแปลงไปโดยใช้พีเอชมิเตอร์

1.4.2 ผลของระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเซลล์ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติก

นำ *L. plantarum* จาก glycerol stock ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหาร

เหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางความเข้มข้นและถ่ายเชื้อลงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์จากสารสกัดถั่วเหลือง และมีปริมาณ Crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ จากถั่วเขียวB (ส่วนตะกอนที่ละเอียด) ปรับพีเอชของอาหาร เป็น 6.5 เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้น10^5 CFU/มล. ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ระยะ late log phase, mid stationary phase และ late stationary phase จากผลข้อ 1.4.1 โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร ทำการเหวี่ยงแยกตัวเซลล์ที่ 10000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ตัวเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ถูกเจือจางด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรของนมพร่องมันเนยคืนรูป (reconstituted skim milk) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน นับจำนวนเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วจึงเก็บตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปทำการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วจึงนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ทำการนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ภาคผนวก ข) คัดเลือกระยะเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ให้ผลการรอดชีวิตของโปรไบโอติกสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.5 ผลของสาร cryoprotectant ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying)

นำ *L. plantarum* จาก glycerol stock ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางความเข้มข้นและถ่ายเชื้อลงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์จากสารสกัดถั่วเหลือง และมีปริมาณ Crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ จากถั่วเขียวB (ส่วนตะกอนที่ละเอียด) ปรับพีเอชของอาหาร เป็น 6.5 เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้น10^5 CFU/มล. ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ระยะ mid stationary phase (เลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง) โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร ทำการเหวี่ยงแยกตัวเซลล์ที่ 10,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ตัวเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ถูกเจือจางด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ของสารละลาย cryoprotectant ได้แก่ นมพร่องมันเนย (reconstituted skim milk) ซูโครส Fructo-oligosacchrides (FOS) สารสกัดถั่วเหลือง, ไฟเบอร์ถั่วเหลือง, สารสกัดข้าวโพด, ไฟเบอร์ข้าวโพด, สารสกัดถั่วเขียว, ไฟเบอร์ถั่วเขียวA,B และ EPSs ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

ทำการผสมให้เข้ากัน นับจำนวนเซลล์ก่อนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แล้วจึงเก็บตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร นำไปทำการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วจึงนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ทำการนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เพื่อทำการคัดเลือกสาร cryoprotectant ที่ให้ผลการรอดชีวิตของโปรไบโอติกสูงสุดเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.6 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในสภาวะที่เลียนแบบทางเดินอาหารส่วนต้น

1.6.1 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในสภาวะที่เป็นกรด

นำ *L. plantarum* ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งด้วยวิธีการที่เหมาะสมจากข้อ 2.5.5 และ เซลล์อิสระของ *L. plantarum* (เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารสกัดจากถั่วเหลืองและไฟเบอร์จากถั่วเขียว) มาทดสอบการทนต่อกรดโดยการเตรียมเซลล์อิสระ ถ่ายเชื้อจาก stock มา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS จำนวน 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย phosphate-buffered saline (PBS) 2 ครั้ง เตรียมเซลล์ซัสเพนชั่นของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของ *L. plantarum* ด้วย phosphate-buffered saline ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการปรับพีเอชเป็น 2, 3, 4 และ 5 ด้วย 8 M HCl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วหาจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีการเติม bromocresal purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่เหลือรอด (นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหาร MRS agar จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) แล้วคำนวณการรอดชีวิตของเชื้อที่ชั่วโมงและพีเอชต่างๆ

1.6.2 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในสภาวะที่มี bile salt

นำ *L. plantarum* ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และ เซลล์อิสระของ *L. plantarum* (เลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมสารสกัดจากถั่วเหลืองและไฟเบอร์จากถั่วเขียว) มาทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีโดยการเตรียมเซลล์อิสระ ถ่ายเชื้อจาก stock มา 0.1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS จำนวน 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตรเหวี่ยงแยกเซลล์ที่

ความเร็ว 10000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย phosphate-buffered saline (PBS) 2 ครั้ง เตรียมเซลล์ซัสเพนชั่นของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งของ *L. plantarum* ด้วย สารละลายเกลือน้ำดี ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วหาจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตโดยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีการเติม bromocresal purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่เหลือรอด (นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหาร MRS agar จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) แล้วคำนวณการรอดชีวิตของเชื้อที่ชั่วโมงต่างๆ

1.7 ผลของอุณหภูมิและบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นำ *L. plantarum* จาก glycerol stock ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางความเข้มข้นและถ่ายเชื้อลงในอาหาร MRS ดัดแปลง ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์จากสารสกัดถั่วเหลือง และมีปริมาณ Crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ จากถั่วเขียวB (ส่วนตะกอนที่ละเอียด) ปรับพีเอชของอาหาร เป็น 6.5 เพื่อให้ได้เชื้อเริ่มต้น 10^5 CFU/มล. ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ระยะ mid stationary phase (เลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง) โดยเก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดไมโครเซ็นติฟิวก์ ขนาด 2 มิลลิลิตร ทำการเหวี่ยงแยกตัวเซลล์ที่ 10000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย โซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ตัวเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ถูกเจือจางด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ของน้ำตาลซูโครสและสารสกัดจากข้าวโพด (ผลิตภัณฑ์ซินไบโอติก) นำไปแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง นำตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งซึ่งมีลักษณะแห้งในหลอดไมโครเซ็นติฟิวส์ขนาด 2 มิลลิลิตร มาทำการบรรจุในขวดแก้วปิดสนิทที่มีการ flush N_2 และสภาพสุญญากาศในถุงลามิเนตปิดสนิท นำผลิตภัณฑ์ไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการรอดชีวิตโดยการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม bromocresal purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหาร MRS agar จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) และหาปริมาณความชื้น ทุก 0, 2, 4, 6 และ 8 สัปดาห์

1.8 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเมื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มทางการค้า

การใช้เชื้อ *L. plan*tarum ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้ว เจือจางด้วยเครื่องดื่มทางการค้า คือ นมสดพาสเจอไรซ์ (ยี่ห้อเมจิ) และน้ำส้มพาสเจอไรซ์ (น้ำส้มเขียวหวาน 100 % ยี่ห้อสไมล์) ได้ปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/กรัม หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 10 % ปริมาตรต่อปริมาตร ลงในเครื่องดื่มทางการค้าที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วฝาปิดสนิท ขนาด 9 มล. ทำการเก็บผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส โดยมีผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มทางการค้าที่ไม่เติม *L. plan*tarum ที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เป็นชุดควบคุม เก็บตัวอย่างทุกสัปดาห์ จนครบ 6 สัปดาห์ เพื่อดูการรอดชีวิตของโปรไบโอติกโดยการนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธีการ spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม bromocresal purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหาร MRS agar จากสีม่วงเป็นสีเหลือง) และทำการวัดพีเอชของผลิตภัณฑ์

1.9 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ใช้การประมวลผลโดยโปรแกรมทางสถิติ คือ โปรแกรม SPSS (Statistical Packages for the Social Science) โดยข้อที่ 1.2 ใช้การออกแบบการทดลองแบบ 4×3 factorial มี 2 ปัจจัย คือ

A คือ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (*Lactobacillus plantarum* TISTR 875, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034, *Bifidobacterium longum* DSM 20215 และ *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456

B คือ อุณหภูมิที่ใช้ในการแช่แข็ง (-20, -80 และ -196(ไนโตรเจนเหลว) องศาเซลเซียส)

ส่วนข้อที่ 1.3-1.8 วิเคราะห์ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (Analysis of variance; One-way ANOVA) และใช้การเปรียบเทียบเชิงซ้อนด้วย Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทุกการทดลองทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2. วัสดุและอุปกรณ์

2.1 ชนิดพืชที่นำมาสกัดเส้นใยอาหาร

2.1.1 ถั่วเหลือง (*Glycine max* (L.) Merr)

2.1.2 ข้าวโพด (*Zea mays* L.)

2.1.3 ถั่วเขียว (*Vigna radiate* (L.) R.Wilczek)

2.2 จุลินทรีย์

2.2.1 จุลินทรีย์โปรไบโอติก

2.2.1.1 *Lactobacillus plantarum* TISTR 875

2.2.1.2 *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034

2.2.1.3 *Bifidobacterium longum* DSM 20215

2.2.1.4 *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456

Lactobacillus plantarum และ *Lactobacillus acidophilus* ได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN) ส่วน *Bifidobacteria bifidum* และ *Bifidobacterium longum* ได้รับมาจาก สถาบัน Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) ประเทศเยอรมัน

2.2.2 แบคทีเรียแลกติกที่ผลิต EPS

2.2.2.1 *Weissella cibaria* A2

เป็นแบคทีเรียแลกติกที่แยกมาจากทางเดินอาหารของหอยแมลงภู่

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ชื่อสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	**บริษัทผู้ผลิต / เกรด/ประเทศ**
1. H_2SO_4	Merck/ analytical/ Germany
2. De Man Rogosa Sharpe (MRS)	Himedia / analytical/ India
3. Tween 80	Ajex Finechem/ analytical/ Australia
4. Nitrogen gas	Com.Grade 98 เปอร์เซ็นต์
5. NaCl	Lab scan/ analytical/ Thailand
6. 3,5-Dinitrosalicylic acid	Fruka/ Germany
7. Phenol	Fisher Scientific/ analytical/ England
8. peptone water	Merck/ Germany
9. yeast extract	Himedia / analytical/ India
10. K_2HPO_4	Ajex Finechem/ analytical/ Australia
11. KH_2PO_4	Ajex Finechem/ analytical/ Australia
12. $MgSO_4.7H_20$	Ajex Finechem/ analytical/ Australia
13. cysteine–HC1	Flucka/ Germany
14. D-Glucose	Ajex Finechem/ analytical/ Australia
15. sucrose	Ajex Finechem/ analytical/ Australia

2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ต่อ)

ชื่อสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต / เกรด/ประเทศ
16. bromocresol purple	Ajex Finechem/ analytical/ Australia
17. skim milk powder	Fluka/ Analytical/ Switzerland
18. Bile salt (Oxgall)	Himedia/ India

2.4 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลอง

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต/ประเทศ
1. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S	Satorius/ USA
2. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S	Satorius/ USA
3. Vortex Mixer	Labnet/ USA
4. กล้องจุลทรรศน์	Nikon/ USA
5. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500	Schwabach/ Germany
6. ตู้ถ่ายเชื้อ (Biological Safety Cabinet) ยี่ห้อ Hotpack (รุ่น 527042, 41, 62, 61 class II type A)	Scientific promotion/ Philadelphia
7. ตู้อบแรงดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS-325	Tomy/ Japan
8. ถาดบ่มเชื้อ 96 หลุม (Microtiter plat 96 flat bottom WI)	NUNC™/ Denmark
9. Microplate reader รุ่น Powerwave X	Biotek/ UK
10. พีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น Metter Toledo 320	Mettier Toledo/ Thailand
11. ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 ไมโครลิตร)	LabMate/ USA
12. ไมโครปิเปต (ขนาด 1000ไมโครลิตร)	Gilson/ France
13. Multichanels pipet (ขนาด 20-200 ไมโครลิตร)	Transferpette® -8/ Germany
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB 14	Memmert/ USA
15. เครื่อง Freeze-dry	FTS system/ USA
16. เครื่องปิดผนึกภาชนะยืดหยุ่นแบบสุญญากาศ	Henko/ Japan
17. ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์เคลือบ 3 ชั้น (ไนลอน โพลิเอทิลีน และ ฟอยด์)	Thailand

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก

1.1 การเตรียมสารสกัดจากธัญพืช

จากการนำธัญพืช ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และข้าวโพดมาทำการสกัด แยกส่วนใสซึ่งเป็นสารสกัดธัญพืช (cereal extract) และส่วนตะกอน (crude fiber) พบว่าธัญพืชแต่ละชนิดจะให้เปอร์เซ็นต์ผลได้ของสารสกัดที่แตกต่างกัน คือ ถั่วเหลืองมีเปอร์เซ็นต์ผลได้ 25.28 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเขียวและข้าวโพดมีเปอร์เซ็นต์ผลได้ 27.33 และ 18.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วนตะกอน (crude fiber) มีเปอร์เซ็นต์ผลได้ 62.01, 65.19 และ 23.06 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อนำสารสกัดมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด พบว่า สารสกัดจากข้าวโพดมีปริมาณน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 841.78 มิลลิกรัมต่อกรัม รองลงมาคือ ถั่วเขียวมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 268.04 มิลลิกรัมต่อกรัม และถั่วเหลืองมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 261.33 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งมีค่าสูงกว่าการทดลองของ โสภา บิลละโสย (2551) ซึ่งทำการสกัดสารสกัดจากถั่วเหลือง และถั่วเขียว ด้วยน้ำมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 261.11 และ 152.93 มิลลิกรัมต่อกรัม และพบว่าสารสกัดจากถั่วเขียวมีปริมาณน้ำตาลสูงกว่าสารสกัดจากถั่วเหลืองนอกจากนี้มีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งข้าวโพดมีน้ำตาลรีดิวซ์มากที่สุดเท่ากับ 154.85 มิลลิกรัมต่อกรัม ในขณะที่ถั่วเหลืองและถั่วเขียวมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 73.7 และ 68.71 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ เมื่อนำค่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดลบกับค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จะบอกถึงส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งเป็นส่วนที่มีแนวโน้มน่าจะเป็นสารพรีไบโอติก คือไม่ถูกดูดซึมหากไม่ถูกย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ก่อน เห็นได้ว่า สารสกัดจากข้าวโพดมีปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์สูงที่สุด รองลงมาคือสารสกัดถั่วเขียวและสารสกัดถั่วเหลือง โดยให้คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่น้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 686.93, 199.33 และ187.63 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ

1.2 การเตรียมสาร Exopolysaccharides (EPSs) จากแบคทีเรียแลกติก

จากการเลี้ยงแบคทีเรีย *Weissella cibaria* A2 ในอาหาร MRS ที่มีซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อทำการสกัด EPSs พบว่า EPSs ที่ได้มีปริมาณเปอร์เซ็นต์ผลได้ของ EPSs เท่ากับ 6.58 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 588.92 และ 67.61 มิลลิกรัมต่อกรัม ตามลำดับ ในขณะที่การทดลองของ นันทินา เชิญทอง (2550) นั้นสกัด EPSs จาก *Weissella cibaria* A2 เช่นกัน แต่ทำการล้างตะกอน 2 ครั้ง มีปริมาณ

ผลได้ของ EPSs เท่ากับ 14 กรัมต่อลิตร และในการทดลองของ วรารัตน์ วงศ์ศุภชาติ (2551) ซึ่งศึกษาการสกัด EPSs จาก *Weissella confusa* โดยใช้อาหาร MRS ที่มีกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และ tryptone 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าสามารถผลิต EPSs ได้ 18 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ยังพบการสกัด EPSs จากแบคทีเรีย *Lactobacillus sp.* ซึ่งแยกได้จากปลาร้า แล้วนำมาเลี้ยงในอาหาร Exopolysaccharide Selection Medium (ESM) ที่มีกาแลคโตส 7 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า EPSs ที่สกัดได้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 277.5 มิลลิกรัมต่อกรัม (จารุวรรณ ยุวเสถียร และตรีทิพพา เลาหประภานนท์, 2541) จะเห็นได้ว่าปริมาณของ EPSs ที่สกัดได้นั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงและสายพันธุ์ของเชื้อด้วย

2. ผลของสายพันธุ์และสภาวะในการแช่แข็งต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying)

เมื่อนำโปรไบโอติก 4 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034, *Bifidobacterium longum* DSM 20215 และ *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 เลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ในขวดฝาปิดสนิทขนาด 10 มล. ที่มีการเติมก๊าซไนโตรเจนลงไปเพื่อสร้างสภาวะไร้อากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเก็บเกี่ยวตัวเซลล์โดยการเหวี่ยงแยกที่ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงทำการเตรียมเซลล์ก่อนทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยการเติม skim milk เป็นสารป้องกันเซลล์ แล้วนำมาแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน 3 สภาวะ คือ -20, -80 และ -196 (ไนโตรเจนเหลว) องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จาก Figure 3. พบว่า *L. acidophilus* มีการลดลงของเชื้อภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งน้อยที่สุดเมื่อทำการแช่แข็งที่ -20 และ -80 องศาเซลเซียส ซึ่งมีการลดลง 0.32 และ 0.62 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ *L. plantarum* ที่ผ่านการแช่งแข็งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาทำแห้งมีการลดลงของเซลล์หลังการทำแห้งน้อยที่สุดคือ 0.18 log CFU/มิลลิลิตร(จาก 9.74 เป็น 9.56 log CFU/มิลลิลิตร) และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับการแช่แข็งที่ -20 และ -80 องศาเซลเซียส *B. bifidum* มีการลดลงของเซลล์หลังการทำแห้งน้อยที่สุดเมื่อผ่านการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว คือ 0.57 log CFU/มิลลิลิตร แต่เมื่อแช่แข็งที่ -80 องศาเซลเซียส มีการลดลงของเชื้อถึง 1.37 log CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่ *B. longum* ที่ผ่านการแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส มีการลดลงของเชื้อ 1.82 log CFU/มิลลิลิตร

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การแช่แข็งเชื้อก่อนการทำแห้งด้วยไนโตรเจนเหลวส่งผลให้ *L. plantarum*, *B. bifidum* และ *B. longum* มีการลดลงของเชื้อน้อยที่สุด

ส่วนการแช่แข็งที่ -20 และ -80 องศาเซลเซียส ให้ผลการลดลงของเชื้อที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เพราะว่าการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำมากๆจะเกิดการแช่แข็งแบบเร็ว ผลึกน้ำแข็งที่เกิดภายในเซลล์มีขนาดเล็ก ในขณะที่การแช่แข็งที่อุณหภูมิสูงจะเกิดการแช่แข็งแบบช้า ผลึกน้ำแข็งในเซลล์มีขนาดใหญ่ เกิดผลกระทบต่อเซลล์ได้มากกว่า (Zhao และ Zhang, 2005)ในขณะที่ *L. acidophilus* ที่ผ่านการแช่แข็งด้วย -20 องศาเซลเซียสนั้น ให้ผลการลดลงของเชื้อน้อยที่สุด

เมื่อพิจารณาในส่วนของสายพันธุ์ก็จะพบว่า *L. acidophilus* และ *L. plantarum* ที่ผ่านการแช่แข็งทั้ง 3 อุณหภูมิ มีการรอดชีวิตหลังการทำแห้งดีกว่า *B. bifidum* และ *B. longum* เนื่องจาก Bifidobacteria นั้นเป็นสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้น้อยกว่า *Lactobacillus* ซึ่งระหว่างกระบวนการทำแห้งนั้นมีโอกาสที่เชื้อสัมผัสกับอากาศด้วย ซึ่งผลการทดลองที่ได้มีความแตกต่างกับผลการทดลองของ Capela และคณะ (2006) ซึ่งศึกษาการรอดชีวิตของโปรไบโอติกสายพันธุ์ *L. acidophilus* และ *B. longum* ที่ทำการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียสแล้วทำการ freeze-dry พบว่า *B. longum* มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่า *L. acidophilus* แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งการรอดชีวิตของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับผนังเซลล์และองค์ประกอบของเมมเบรน ของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ (Carvalho *et al*., 2004) ในการทดลองครั้งนี้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์และวิธีการแช่แข็งที่ส่งผลให้การรอดชีวิตของโปรไบโอติกหลังการทำแห้งดีที่สุด จึงคัดเลือก *L. plantarum* ที่ผ่านการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวใช้ในการทดลองต่อไป

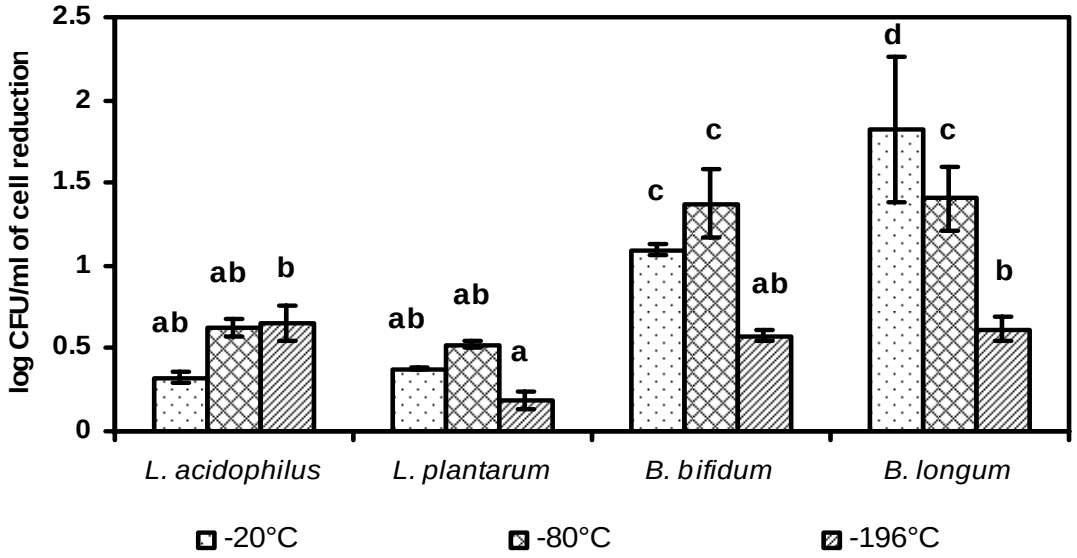


Figure 3. Effect of freezing temperature on cell reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034, *Bifidobacterium longum* DSM 20215 and *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456

3. ผลของสภาวะในการเลี้ยงโปรไบโอติกต่อการรอดชีวิตภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying)

3.1 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

จากข้อ 2. นำ *L. plantarum* TISTR 875 มาทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยการปรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดให้เท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1000 มิลลิกรัมต่อกรัม) จากสารสกัดถั่วเหลือง, สารสกัดข้าวโพด, สารสกัดถั่วเขียว Fructo-oligosacchrides (FOS) น้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส และไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโต พบว่า ในช่วงชั่วโมงที่ 9 ลักษณะการเจริญแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกจะมีการเจริญสูงกว่า อยู่ในช่วง 8.80 – 8.97 log CFU/มิลลิลิตร ได้แก่ *L. plantarum* ที่เลี้ยงในอาหารที่มี กลูโคส, สารสกัดถั่วเหลือง และสารสกัดข้าวโพด เป็นแหล่งคาร์บอน ส่วนกลุ่มที่สองมีการเจริญอยู่ในช่วง 7.86 – 8.14 log CFU/มิลลิลิตร คือ *L. plantarum* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนของ ซูโครส, สารสกัดถั่วเขียว, FOS และไม่เติมแหล่งคาร์บอน แต่เห็นความแตกต่างเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 *L. plantarum* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีน้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลการเจริญดีที่สุด ส่วนการเลี้ยงเชื้อโดยใช้สารสกัดจากสารสกัดถั่วเหลือง, สารสกัดข้าวโพด, สารสกัดถั่วเขียว, FOS, น้ำตาลกลูโคส และไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน โดยให้ผลการเจริญที่ไม่แตกต่างกัน (Figure 4.) ซึ่งสารสกัดจากธัญพืชทั้งสามชนิดสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของ *L. plantarum* ได้เช่นเดียวกับการใช้กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน สอดคล้องกับการทดลองของ โสภา บิลละโสย (2551) ซึ่งศึกษาการเจริญเติบโตของ *L. plantarum* โดยใช้ สารสกัดเอทานอลจากถั่วเขียว เป็นแหล่งคาร์บอนสามารถส่งเสริมการเจริญได้ดี โดยมีการเพิ่มขึ้นของเชื้อในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 2.94 log CFU/มิลลิลิตร (จากเริ่มต้น 4.94 เป็น 7.88 log CFU/มิลลิลิตร) เมื่อเทียบกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งมีจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้น 2.81 log CFU/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีการนำสารสกัดจากพืชอีกหลายชนิดมาใช้ส่งเสริมการเจริญของโปรไบโอติก เช่น การใช้สารสกัดจากพืชหัว เช่น มันเทศสีม่วงเปลือกแดง มันฝรั่ง บีทรูท และมันเทศสีม่วงเปลือกเหลือง ซึ่งจะพบว่าสารสกัดทั้ง 4 ชนิดสามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. plantarum* ได้ดีเช่นกัน (นิรัญญา บุญติ้น, 2550) และจากการรายงานของ Sako และคณะ (1999) ทดสอบความสามารถของแบคทีเรีย ในการใช้ lactulose และ rafinose เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus* สามารถใช้ lactulose และ raffinose ได้ใกล้เคียงกับกลูโคสซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองที่สารสกัดจากถั่วซึ่งเป็นกลุ่มของ raffinose สามารถส่งเสริมการเจริญของ *L. plantarum* ได้ใกล้เคียงกับการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

และการที่แบคทีเรียโปรไบโอติกแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกได้ไม่เท่ากันนั้น เนื่องจากความหลากหลายในเรื่องของโครงสร้างและการสร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อยโมเลกุลเหล่านั้น ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติกมีองค์ประกอบและการเชื่อมต่อกันระหว่างพันธะภายในโมเลกุลต่างกัน เช่น ฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ มีพันธะที่เชื่อมต่อกันด้วย Fruβ2-1Fru$_n$, และ Gluα1-2[βFru1-2]$_n$, Raffinose จะต่อกันด้วย Galα1-6Glu1-2βFru และ lactosucrose จะต่อกันด้วย Galβ1-4 Gluα1-4 Gluα1-2βFru เป็นต้น (Rastall and Gibson, 2002) ดังนั้นแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะต้องสร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อยสารเหล่านี้เพื่อที่จะนำสารเหล่านี้ไปใช้ ซึ่งเอนไซม์ที่แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์ผลิตขึ้นจะมีความจำเพาะต่อสารแต่ละชนิดแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* สามารถผลิตเอนไซม์ α-galactosidase, β-galactosidase, α-glucosidase β-glucosidase และ α-mannosadase ขึ้นมาได้ (Papamanoli *et al*., 2003)

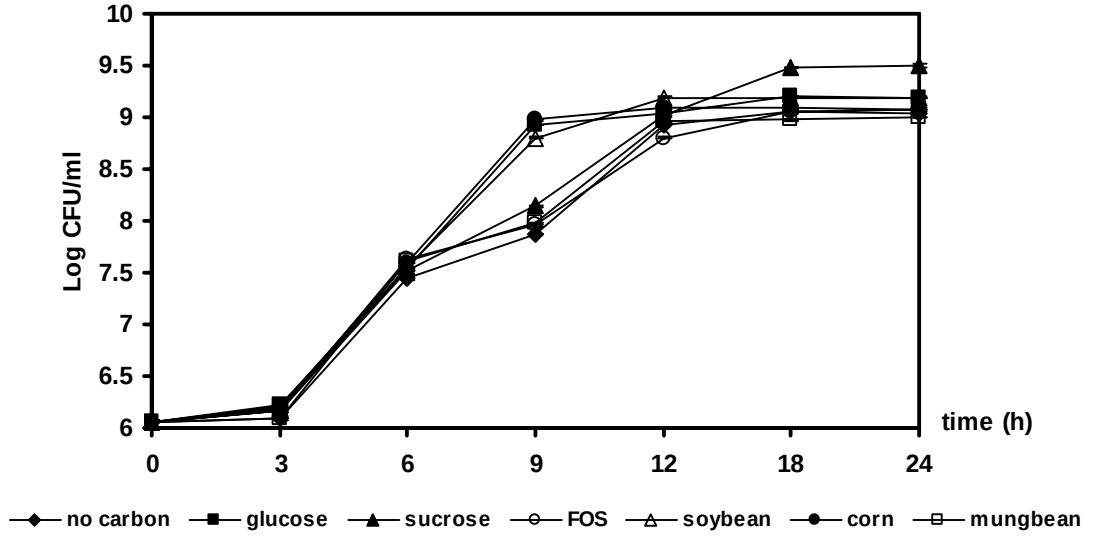


Figure 4. Growth of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 cultivated in MRS medium contained soybean extract, corn extract, mungbean extract, FOS, sucrose, glucose as carbon sources.

เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้ skim milk เป็นสารป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ พบว่า การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีสารสกัดจากถั่วเหลือง สารสกัดจากข้าวโพด และสารสกัดจากถั่วเขียว เป็นแหล่งคาร์บอน มีจำนวนการลดลงของเซลล์หลังจากทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีจำนวนเซลล์ลดลง 0.11, 0.15 และ 0.12 log CFU/มิลลิลิตร (Figure 5.) แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับจำนวนเซลล์ที่ลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนอีก 4 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส FOS น้ำตาล

ซูโครส และการไม่เติมแหล่งคาร์บอน โดยมีการลดลง 0.26, 0.44, 0.54 และ 0.56 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยการที่ใช้สารกลุ่มธัญพืชเป็นแหล่งคาร์บอนให้การรอดชีวิตหลังการทำแห้งที่ดีกว่า อาจเนื่องมาจากสารสกัดจากธัญพืชที่ใช้มีการสกัดจากน้ำขั้นตอนเดียว ไม่ได้ผ่านกระบวนการจนได้สารพรีไบโอติกที่บริสุทธิ์ ดังนั้นในสารสกัดเหล่านี้จึงมีองค์ประกอบอื่นเช่น ไขมัน อยู่อีกนอกจากน้ำตาลซึ่งใช้ในส่วนของการเจริญเติบโต ซึ่งองค์ประกอบเหล่านั้นที่ยังไม่ถูกใช้จึงมีส่วนในการป้องกันเซลล์อีกชั้นหนึ่งจากสภาวะการทำแห้ง ในขณะที่การใช้สารกลุ่มน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นสารกลุ่มนี้จะถูกใช้หมดไปในส่วนของกระบวนการเจริญเติบโต จึงมีเพียง skim milk ที่เติมลงไปเท่านั้นเป็นส่วนช่วยป้องกันเซลล์จากการทำแห้ง ดังนั้นการใช้สารสกัดจากธัญพืชเป็นแหล่งคารบนอนนั้นมีส่วนช่วยในเรื่องของการรอดชีวิตจากการทำแห้ง โดยเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของการรอดชีวิตพบว่า การใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนนั้นให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงสุด คือ 98.72 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ค) จึงทำการคัดเลือกสารสกัดจากถั่วเหลืองมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

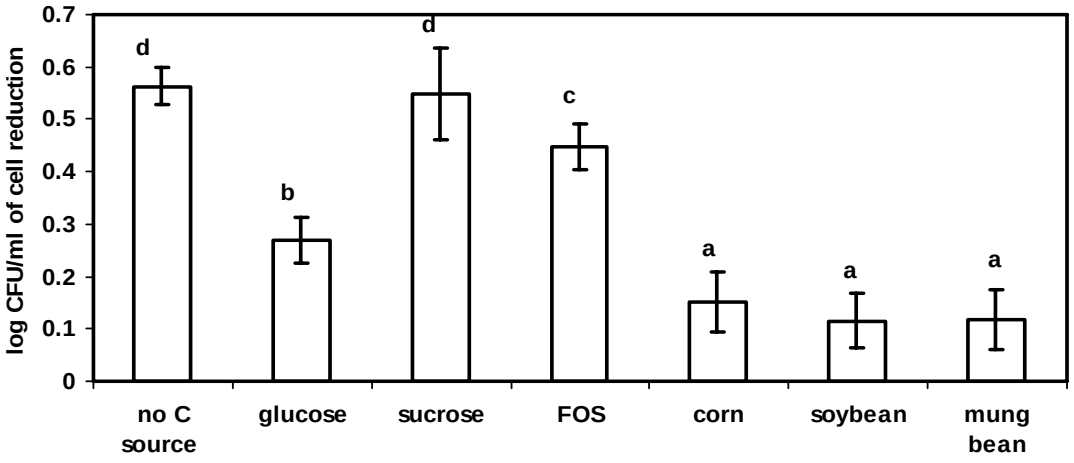


Figure 5. Effect of freeze-drying on cell reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract, corn extract, mungbean extract, FOS, sucrose glucose as carbon sources.

3.2 ผลของ Crude fiber ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นำ *L. plantarum* TISTR 875 มาทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยการปรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดให้เท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1000 มิลลิกรัมต่อกรัม) จากสารสกัดถั่วเหลือง และมีปริมาณ Crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ จาก ถั่วเหลือง

ข้าวโพด ถั่วเขียวA(ส่วนตะกอนที่หยาบ) ถั่วเขียวB(ส่วนตะกอนที่ละเอียด) และ EPSs โดยมีชุดที่ไม่เติม Crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นชุดควบคุม ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโต พบว่า ในช่วง 21 ชั่วโมง การเจริญของ *L. plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 6 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 การเติม crude fiber ของถั่วเหลืองลงไปในอาหารส่งผลให้ การเจริญเติบโตของ *L. plantarum* มีการเพิ่มจำนวนขึ้นของเซลล์ 4.6 log CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่การไม่เติม crude fiber มีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ 3.80 log CFU/มิลลิลิตร ส่วนที่เหลือนั้นไม่มีความแตกต่างกันกับการไม่เติม crude fiber ดังแสดงใน Figure 6.

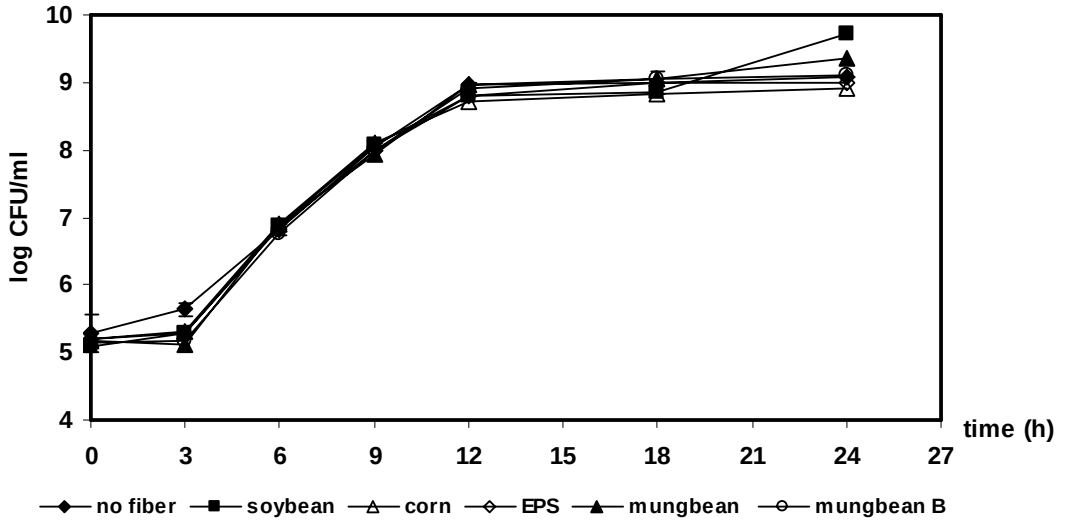


Figure 6. Growth of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 cultivated in MRS medium contained soybean extract as carbon sources and crude fiber 2 % from soybean, corn, mungbean A , mungbean B and EPSs.

เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้นมพร่องมันเนยเป็นสารป้องกันการบาดเจ็บ พบว่า การลดลงของจำนวนเซลล์หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยสามารถเรียงลำดับของจำนวนเซลล์ที่ลดลงจากน้อยสุดไปหามากสุดได้ โดยเริ่มต้นจาก การเติม crude fiber ของถั่วเขียวชนิดละเอียด (B), EPSs, ถั่วเขียวชนิดหยาบ (A), การไม่เติม crude fiber, ถั่วเหลือง และข้าวโพด โดยมีการลดลงของจำนวนเซลล์หลังการทำแห้ง 0.25, 0.35, 0.44, 0.51, 0.72 และ 1.02 ตามลำดับ (Figure 7.) แต่เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตพบว่า การเติม crude fiber ของถั่วเขียวชนิดละเอียดให้การรอดชีวิตสูงที่สุด 97.24 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการเติม crude fiber ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น

เพื่อต้องการใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติของความเป็นรูพรุนของ crude fiber ช่วยในการเป็นตัวพยุงและยึดเกาะของเซลล์ เพื่อป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์จากสภาวะการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แต่ประโยชน์ที่เกิดขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะของ crude fiber แต่ละชนิดด้วย (Michida *et al*., 2006)

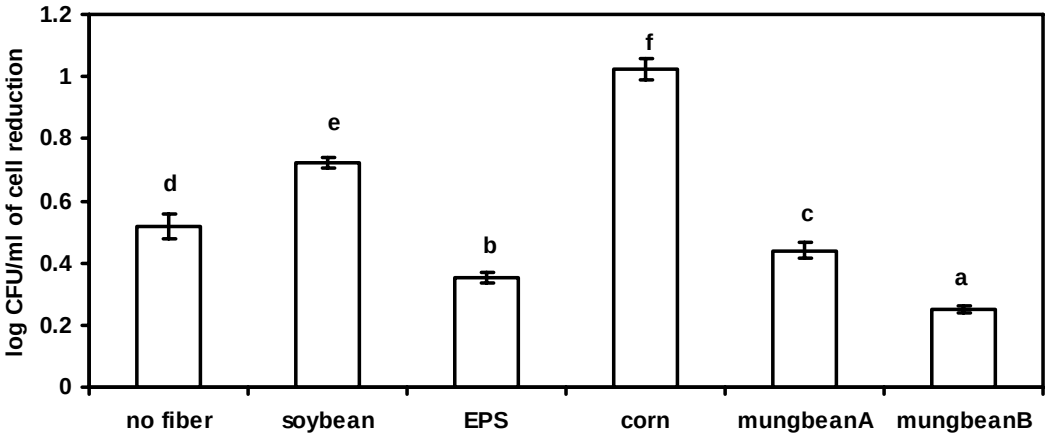


Figure 7. Effect of freeze-drying on cell reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 grown in MRS medium containing 2 % soybean extract and 2 % crude fiber from soybean, corn, mungbean A, mungbean B and EPSs.

3.3 ผลของพีเอชต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือก แข็ง

นำ *L. plantarum* TISTR 875 มาทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยการปรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดให้เท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1000 มิลลิกรัมต่อกรัม) จากสารสกัดถั่วเหลือง และมีปริมาณ Crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเขียวB(ส่วนตะกอนที่ละเอียด) และปรับพีเอชของอาหารเป็น 4, 5 และ 7 โดยชุดควบคุมเป็นพีเอชของอาหาร MRS ปกติซึ่งเท่ากับ 6.5 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโต พบว่า การเจริญเติบโตของ *L. plantarum* ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด มีความแตกต่างกัน จาก Figure 8. พบว่า การเจริญเติบโตของ *L. plantarum* ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพีเอช 4 ในช่วง 3 ชั่วโมงแรกใกล้เคียงกับการเลี้ยงในอาหารอีก 3 ชนิด แต่เห็นความแตกต่างเมื่อชั่วโมงที่ 6 ซึ่งการเจริญเติบโตของ *L. plantarum* ที่เลี้ยงในอาหารพีเอช 4 ต่ำสุด ส่วนที่เหลือนั้นไม่มีความแตกต่างกัน จนครบ 24 ชั่วโมง การเพิ่มขึ้นของเซลล์ก็ไม่แตกต่างกันทั้ง 4 ชนิดอาหาร

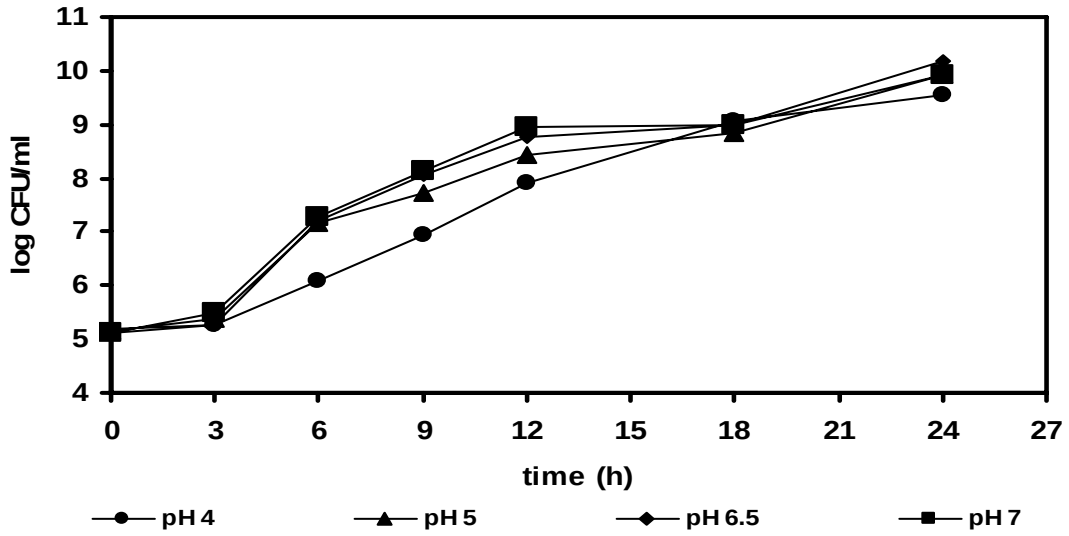


Figure 8. Effect of pH on growth of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 grown in MRS medium containing 2 % soybean extract and 2 % mungbean B crude fiber.

เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้นมพร่องมันเนยเป็นสารป้องกันการบาดเจ็บ พบว่า การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีสารสกัดจากถั่วเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติม crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ของถั่วเขียวในส่วนที่ละเอียดและใช้พีเอชอาหารควบคุม (6.5) มีการลดลงของจำนวนเซลล์หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งน้อยที่สุด 0.40 log CFU/มิลลิลิตร ถัดมาคือการเลี้ยงเชื้อในอาหารพีเอช 7, 5 และ 4 ตามลำดับ ซึ่งมีการลดลงของเซลล์หลังการทำแห้ง 1.03, 1.21 และ 1.78 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Figure 9.) ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งการเลี้ยง *L. plantarum* ในอาหารพีเอช 6.5 แล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เมื่อเวลา 24 ชั่วโมงนั้นเป็นช่วงที่เชื้อเข้าสู่ระยะที่เหมาะสมต่อการเก็บเกี่ยวเซลล์ เป็นช่วงที่เชื้อมีความคงตัว และแข็งแรง ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมภายนอก ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อในอาหารพีเอช 4 ช่วงที่ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์นั้นยังอยู่ในช่วงที่เชื้อยังมีการเจริญอย่างเต็มที่ยังไม่มีความคงตัวที่จะทนต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมภายนอก ส่งผลให้เมื่อนำมาทำแห้งจึงมีการรอดชีวิตที่น้อยกว่า ซึ่งในการทดลองของ Palmfeldt และ Hahn-Hagerdal (2000) ศึกษาผลของพีเอชต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus reuteri* ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 5 และ 6 มีอัตราการเจริญของเชื้อเท่ากับ 0.67 และ 0.72 ตามลำดับ โดยที่พีเอช 6 การเจริญเข้าสู่ช่วง stationary phase หลังจาก 10 ชั่วโมง แต่พีเอช 5 12 ชั่วโมง และเมื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่าเชื้อที่เลี้ยงในอาหารพีเอช 5 ให้การรอดชีวิต 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เชื้อที่เลี้ยงในอาหารพีเอช 6 มีอัตราการรอดชีวิตหลังการทำแห้ง ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ โดยระยะเวลาเก็บเกี่ยวในช่วง stationary phase ไม่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต และมีการ

กล่าวไว้ว่าภาวะอดอยากส่งผลต่อการปกป้องเซลล์จากสภาวะตึงเครียด (Hartke *et al*., 1994) และสภาวะตึงเครียดมักจะชักนำมาจากพีเอชที่ต่ำและการใช้หมดของคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจากการทดลองดังกล่าวไม่สอดคล้องกับการทดลองนี้ อาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ของเชื้อที่ต่างกัน ซึ่งมีผลต่อการอดชีวิตของเชื้อภายหลังจากการทำแห้งดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ในการทดลองจึงทำการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับพีเอชเป็น 6.5 เพื่อใช้เลี้ยงเชื้อในการดำเนินการทดลองต่อไป

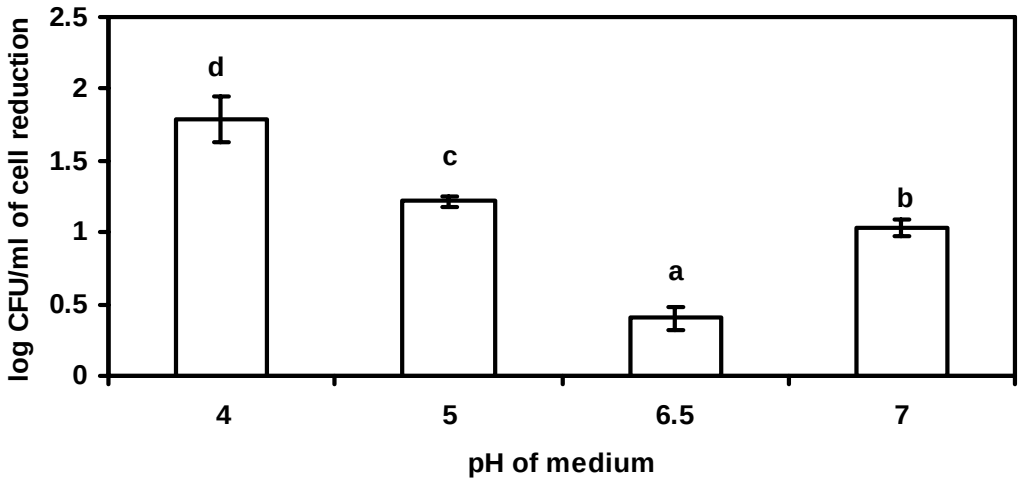


Figure 9. Effect of freeze-drying on cell reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 grown in MRS medium containing 2 % soybean extract and 2 % mungbean B crude fiber at pH 4, 5, 6.5 and 7.

3.4 ผลของอุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นำ *L. plantarum* TISTR 875 มาทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยการปรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดให้เท่ากับน้ำตาลกลูโคส 1000 มิลลิกรัมต่อกรัม) จากสารสกัดถั่วเหลือง และมีปริมาณ Crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ ถั่วเขียวB(ส่วนตะกอนที่ละเอียด) และปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.5 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดการเจริญเติบโต พบว่า หลังจากชั่วโมงที่ 6 มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนของการเจริญเติบโตจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 24 จาก Figure 10. พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมีการเจริญดีที่สุด รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งผ่านไป 24 ชั่วโมงยังไม่เข้าสู่สภาวะคงที่ของเชื้อ ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสนั้นมีการเจริญของเชื้อต่ำที่สุด โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงของเชื้อแต่ละชนิดจะไม่

เหมือนกันขึ้นอยู่กับชนิดของสายพันธุ์ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง พบว่า *Lactobacillus* มีช่วงอุณหภูมิในการเจริญ 2-53 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส

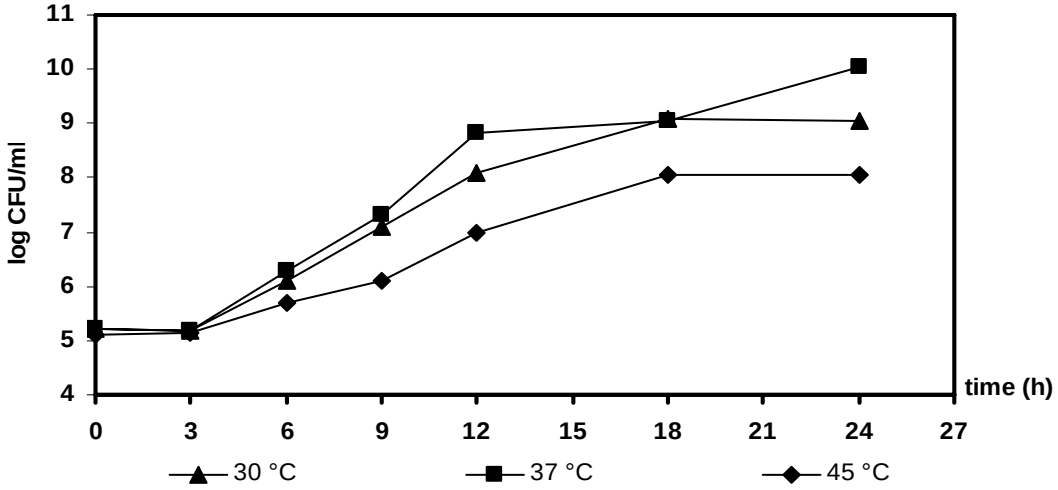


Figure 10. Effect of temperature on growth of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 cultivated in MRS medium containing 2 % soybean extract , 2 % mungbean B crude fiber , pH 6.5 and incubated at 30, 37 and 45°C.

เมื่อเลี้ยงเชื้อครบ 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ มาทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้นมพร่องมันเนยเป็นสารป้องกันการบาดเจ็บ พบว่า การเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีสารสกัดจากถั่วเหลือง เป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติม crude fiber 2 เปอร์เซ็นต์ของถั่วเขียวในส่วนที่ละเอียดและใช้พีเอชอาหารเป็น 6.5 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียสให้การรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 875 ที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีการลดลงของเซลล์ภายหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 0.51 และ 0.44 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ (Figure 11.) ส่วนการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมีการลดลงของเซลล์หลังจากการทำแห้งมากที่สุด 1.09 log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งการเลี้ยงที่อุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียสนั้นไม่เหมาะสมต่อการเจริญของ *L. plantarum* แม้จะมีคำกล่าวที่ว่าภาวะอดอยาก หรือภาวะตึงเครียดส่งผลต่อการปกป้องเซลล์ก็ตาม แต่เนื่องจากทำการเก็บเกี่ยวเซลล์แค่ 24 ชั่วโมง ซึ่งการเจริญของเซลล์ต่ำส่งผลต่อการรอดชีวิตหลังการทำแห้งเช่นกัน มีการศึกษาของ Schoug และคณะ (2007) พบว่าการเจริญที่เหมาะสมของกลุ่ม lactobacillus มีพีเอชที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.4 และ 5.8 ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 30 และ 40 องศาเซลเซียส และเมื่อผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง มีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับหลายการทดลองที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแบคทีเรียแลคติก ในการ

ทดลองนี้ทำการคัดเลือกอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในการวางเลี้ยงเชื้อเนื่องจากให้อัตราการรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 875 สูงที่สุด 94.77 เปอร์เซ็นต์ และส่งเสริมการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุดด้วย ไปใช้ในการทดลองต่อไป

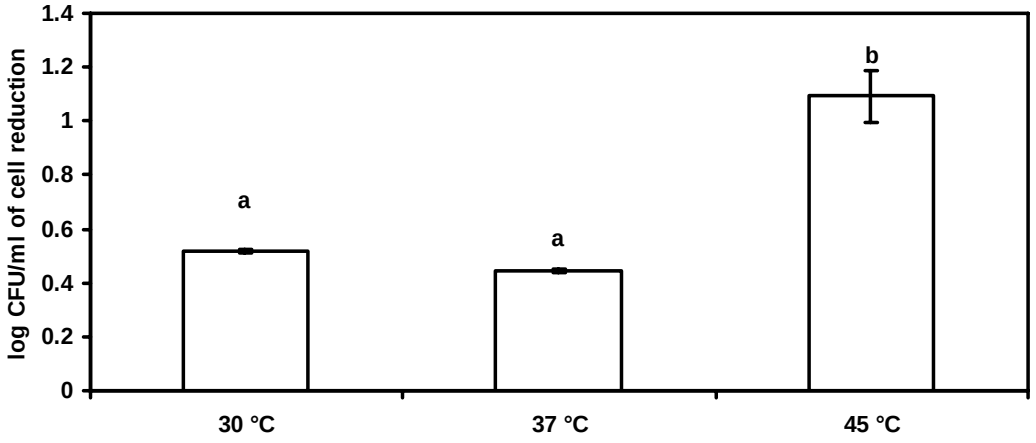


Figure 11. Effect of freeze-drying on cell reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 grown at 30, 37 and 45°C in MRS medium containing 2 % soybean extract, 2 % mungbean B crude fiber and pH 6.5.

4, ผลของระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวเซลล์ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying)

4.1 ศึกษาการเจริญของโปรไบโอติกในสภาวะที่เหมาะสม

Lactobacillus plantarum TISTR 875 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS ดัดแปลง มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์จากสารสกัดถั่วเหลือง เติม crude fiber ของถั่วเขียว(ตะกอนละเอียด) 2 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.5 ทำการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อดูการเจริญเติบโต โดยการนับจำนวนจุลินทรีย์และการวัดพีเอชที่ลดลง ที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง ดังแสดงใน Figure 12.

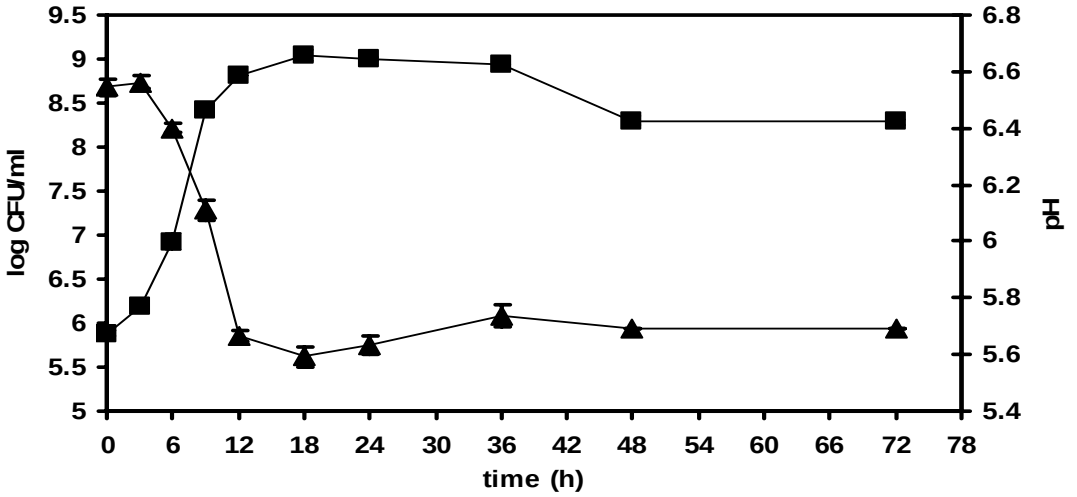


Figure 12. Change of pH (▲) and Growth (■) of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 cultivated in MRS medium containing 2 % soybean extract, 2 % mungbean B crude fiber and pH 6.5 at 37°C.

จากภาพพบว่าเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 9 ชั่วโมงแรกและจะค่อยๆคงที่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 36 โดยมีจำนวนเชื้อสูงสุดอยู่ที่ 9.04 log CFU/มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 18 และจะลดลงในชั่วโมงที่ 48 จนถึงชั่วโมงที่ 72 ซึ่งมีจำนวนเซลล์ 8.28 log CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่พีเอชของอาหารเริ่มต้น 6.5 จะค่อยๆลดลงและคงที่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีพีเอช 5.66 จนกระทั่งชั่วโมงที่ 72 มีค่าพีเอชเท่ากับ 5.69 จากการทดลองทำให้ทราบระยะ log phase คือ ชั่วโมงที่ 0 - 9 stationary phase ชั่วโมงที่ 12 - 36 และ death phase คือ ชั่วโมงที่ 48 - 72 ในการทดลองต่อไปนั้นต้องการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ระยะ late log phase คือ ชั่วโมงที่ 9 mid stationary phase คือ ชั่วโมงที่ 24 และ late stationary phase คือ ชั่วโมงที่ 36

4.2 ผลของระยะเวลาในการเจริญต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกภายหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

ทำการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 ในอาหาร MRS ดัดแปลง มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์จากสารสกัดถั่วเหลือง เติม crude fiber ของถั่วเขียว(ตะกอนละเอียด) 2 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.5 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ระยะ late log phase, mid stationary phase และ late stationary phase ซึ่งก็คือ ชั่วโมงที่ 9, 24 และ 36 ตามลำดับ แล้วนำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่า การลดลงของจำนวนเซลล์ ของทั้ง 3 ระยะที่ทำการเก็บเกี่ยวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) คือ 0.19, 0.16 และ

0.18 log CFU/มิลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 13. นั่นหมายถึงระยะเก็บเกี่ยวไม่มีผลต่อการรอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง แต่ในการทดลองที่ผ่านมาของ Corcoran และคณะ (2004) พบว่าที่ระยะ stationary phase เชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* มีการรอดชีวิตหลังการทำแห้ง 31-50 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ระยะ log phase มีการรอดชีวิต 14 เปอร์เซ็นต์ และที่ระยะ lag phase เซลล์รอดชีวิตน้อยที่สุด 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับ Mary และคณะ (1986) ซึ่งพบว่า Rhizobia มีการรอดชีวิตสูงสุดที่ระยะ stationary phase และมีการรอดชีวิตของ *Sinorhizobium* และ *Bradyrhizobium* ที่เก็บตัวอย่างจากระยะ stationary phase มาทำแห้ง มีการรอดชีวิตสูงกว่าตัวอย่างที่เก็บจากระยะ log phase (Boumahdi *et al*., 1999) โดยอาจกล่าวได้ว่าระยะที่เหมาะสมต่อการรอดชีวิตระหว่างการทำแห้งขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ เมื่อพิจารณาในส่วนของอัตราการรอดชีวิต พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 97.84, 98.17 และ 98.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ในการทดลองนี้ทำการเลือกเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ระยะ mid stationary phase คือที่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งให้การเจริญของเชื้อสูงกว่าในระยะอื่นโดยมีจำนวนเซลล์อยู่ที่ 8.99 log CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่ระยะ late log phase และ late stationary phase มีจำนวนเซลล์ เท่ากับ 8.40 และ 8.93 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ และในระยะ mid stationary phase เป็นช่วงที่เชื้อมีความคงตัว สามารถทนต่อสภาวะการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมภายนอก ในขณะที่อีกสองระยะการเจริญนั้น อยู่ในช่วงของการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะใหม่ สภาวะแวดล้อมภายนอกจึงมีผลกระทบต่อเซลล์ด้วย

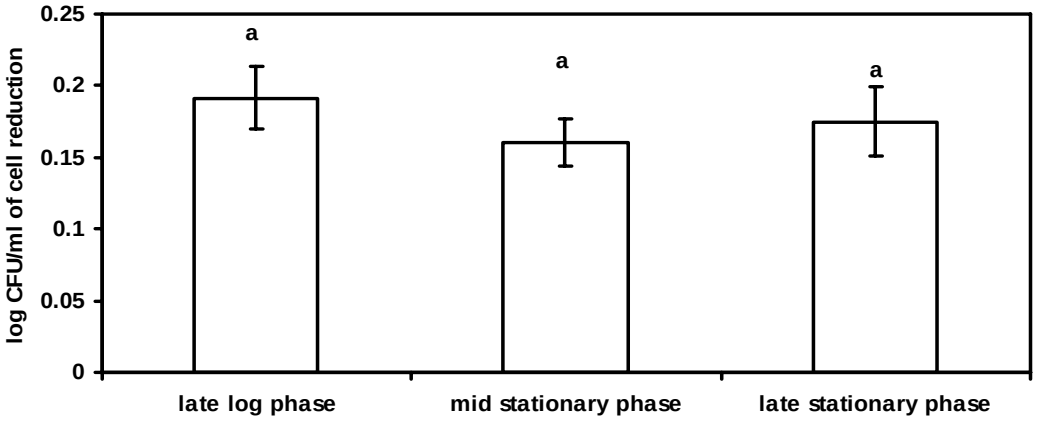


Figure 13. Effect of cell harvested at late log phase, mid stationary phase and late stationary phase on the reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 grown in MRS medium containing 2 % soybean extract and 2 % mungbean B crude fiber, pH 6.5 at 37°C after freeze-dry.

5. ผลของสาร cryoprotectant ต่อการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying)

ทำการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 ในอาหาร MRS ดัดแปลง มีการใช้แหล่งคาร์บอน 2 เปอร์เซ็นต์จากสารสกัดถั่วเหลือง เติม crude fiber ของถั่วเขียว(ตะกอนละเอียด) 2 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.5 ทำการวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ระยะ mid stationary phase) เก็บเกี่ยวเซลล์ ทำการเจือจางด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตรของสารละลาย cryoprotectant ดังนี้ นมพร่องมันเนย (skim milk), ซูโครส, Fructo-oligosacchrides (FOS), สารสกัดถั่วเหลือง, crude fiber ถั่วเหลือง, สารสกัดข้าวโพด, crude fiber ข้าวโพด, สารสกัดถั่วเขียว, crude fiber ถั่วเขียว A,B และ EPSs แช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว แล้วนำเข้าสู่กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง พบว่า การลดลงของจำนวนเซลล์ของการใช้สาร cryoprotectant แต่ละชนิด หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งนั้นมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) โดยการใช้ซูโครส 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นสาร cryoprotectant นั้นมีการลดลงของเซลล์หลังทำแห้งน้อยที่สุด 0.19 log CFU/มิลลิลิตร รองลงมา คือ สารสกัดจากข้าวโพด และ skim milk ซึ่งเป็นสาร cryoprotectant ที่ใช้ในการทั้งลองก่อนหน้านี้ มีการลดลงของเซลล์ 0.26 และ 0.34 log CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่การใช้ crude fiber ของถั่วเหลืองเป็นสาร cryoprotectant มีการลดลงของเซลล์หลังการทำแห้งมากที่สุด 1.48 log CFU/มิลลิลิตร ดังใน Figure 14. ซึ่งเห็นได้ว่าการใช้ส่วนของสารสกัดซึ่งจะมีลักษณะที่ละลายเป็นเนื้อเดียวกันนั้นมีการลดลงของเซลล์หลังการทำแห้งน้อยกว่าการใช้ในส่วนของ crude fiber เป็นสาร cryoprotectant ถึงแม้ว่า crude fiber นั้นจะมีประโยชน์ในส่วนขององค์ประกอบที่เป็นรูพรุนก็ตาม และเมื่อเทียบระหว่างการนำส่วนของสารสกัดและcrude fiber มาใช้เป็น cryoprotectant เทียบกับการใช้สาร cryoprotectant ที่ใช้กันทั่วไปคือ น้ำตาลซูโครส และ skim milk พบว่า ซูโครส นั้นเสริมการรอดชีวิตของเชื้อหลังการทำแห้งได้ดีกว่า ในขณะที่ สารสกัดจากข้าวโพด สามารถส่งเสริมการรอดชีวิตได้ดีกว่าการใช้ skim milk ดังนั้นการใช้สารสกัดและ crude fiber จากธัญพืชบางชนิด จึงเหมาะสำหรับการเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยในเรื่องของการเจริญเติบโตและการเป็นตัวพยุงและยึดเกาะของเซลล์ในระหว่างการเลี้ยง

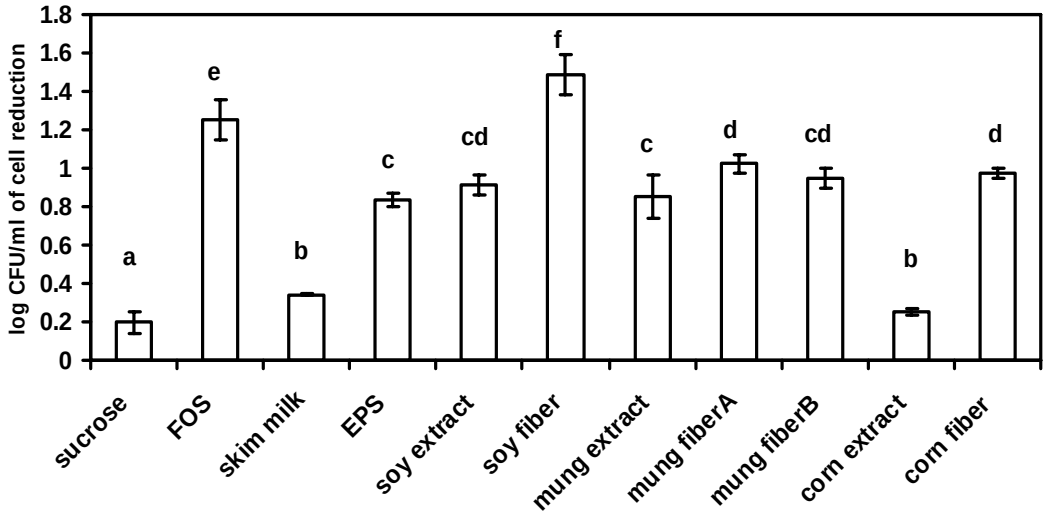


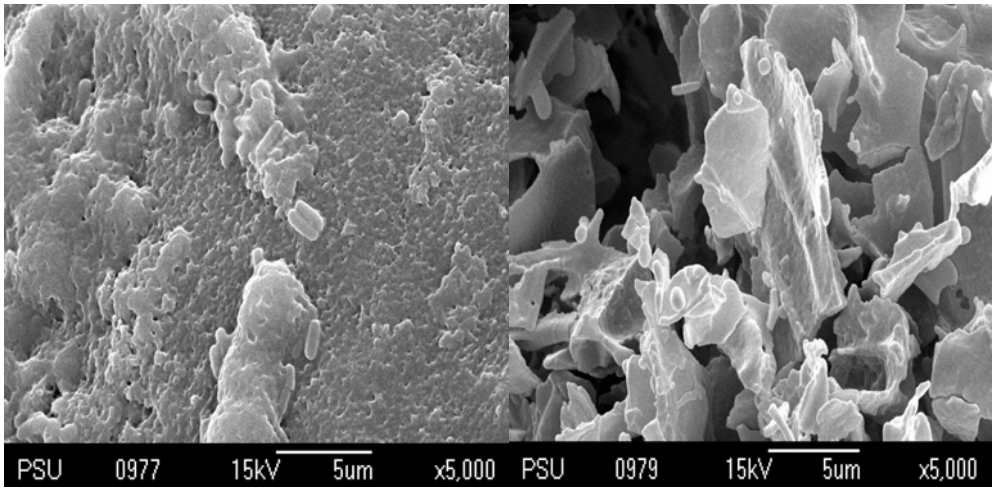
Figure 14. Effect of cryoprotectants on cell reduction of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 grown in MRS medium containing 2 % soybean extract, 2 % mungbean B crude fiber, pH 6.5 at 37°C and harveated at mid stationary phase after freeze-dry.

สาร cryoprotectant ก็มีด้วยกันหลายชนิด ที่นิยมใช้ได้แก่ นมพร่องมันเนยคืนรูป (reconstituted skim milk) ซูโครส เป็นต้น ซึ่งการเลือกใช้วัสดุหรือตัวกลางเพื่อป้องกันจุลินทรีย์อย่างเหมาะสมจะทำให้โปรไบโอติกมีอัตราการรอดชีวิตที่สูง Saarela และคณะ (2006) ที่ศึกษาการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* E800 และ *Lactobacillus rhamnosus* E522 โดยใช้ไฟเบอร์ของแอปเปิ้ล ข้าวโอ๊ตที่มีส่วนประกอบของ β-glucan 10 และ 20 เปอร์เซ็นต์เป็นองค์ประกอบ wheat dextrin, polydextrose และ อินนูลิน เป็นสาร cryoprotectant ในการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เปรียบเทียบกับการใช้ ซูโครสเป็น cryoprotectant พบว่า *Lactobacillus rhamnosus* ทั้งสองสายพันธุ์ให้ผลการรอดชีวิตที่ใกล้เคียงกัน โดยการใช้ cryoprotectant ที่เป็น wheat dextrin และ polydextrose มีอัตราการรอดชีวิตใกล้เคียงกับการใช้ซูโครสเป็น cryoprotectant แต่สูงกว่าการใช้พรีไบโอติกชนิดอื่นเป็น cryoprotectant หลังจากผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นอกจากนี้ในรายงานของ Otero และคณะ (2007) ที่พบว่าการใช้ skim milk 6 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับซูโครส 6 เปอร์เซ็นต์เป็นสาร cryoprotectant จะทำให้เชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* มีปริมาณลดลงหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร และน้อยกว่าการใช้น้ำเป็นสารตัวกลางอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีปริมาณเชื้อลดลง 9 log CFU ต่อมิลลิลิตร แต่ไม่จำเป็นว่านมผงพร่องมันเนยจะเหมาะสมสำหรับเชื้อทุกชนิด เช่นจากการทดลองของ Costa (2000) ที่ทำแห้งเชื้อ *Pantoea agglomerans* CPA-2 ด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง และใช้สารตัวกลางต่าง ๆ ในการทำแห้ง

พบว่า น้ำตาลพวกไดแซคคาร์ไรด์ให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *Pantoea agglomerans* CPA-2 สูงที่สุดมากกว่า 60.00 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การใช้นมผงพร่องมันเนยให้อัตราการรอดชีวิตที่ 15.00 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น เช่นเดียวกับในการทดลองนี้ที่การใช้ซูโครสและสารสกัดจากข้าวโพดเป็นสาร cryoprotectant มีอัตราการรอดชีวิตหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งดีกว่าการใช้ skim milk ซึ่งเห็นได้จากลักษณะการเคลือบของสาร cryoprotectant ทั้ง 2 ชนิด หลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง Figure 15. แสดงภาพถ่ายจากกล้อง SEM ของเชื้อ *L. plantarum* ที่ใช้ซูโครส skim milk และสารสกัดจากข้าวโพดเป็นสาร cryoprotectant พบว่า สารละลายซูโครส และสารสกัดจากข้าวโพด จะเคลือบตัวเซลล์ทั้งหมดไว้เป็นกลุ่มก้อนเหมือนกัน โดยตัวเซลล์จะยึดติดและฝังตัวกับอนุภาคและรูพรุนของสารที่เติมลงไป ในขณะที่การใช้ skim milk มีการกระจายของเซลล์อยู่ทั่วไปในรูปแบบแขวนลอยและบางส่วนฝังตัวกับผลึกของ skim milk ที่จับตัวกันเมื่อผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง จึงเป็นเหตุให้ซูโครสและสารสกัดจากข้าวโพดเป็น cryoprotectent ที่ดีกว่าสำหรับการทดลองนี้ เนื่องจากมีราคาที่ถูกกว่าและให้การรอดชีวิตที่ดีกว่าด้วย ส่วนนมผงพร่องมันเนยซึ่งช่วยให้เชื้อมีการรอดชีวิตที่ดีรองลงมาจากการใช้สารสกัดจากข้าวโพด เนื่องจากนมผงพร่องมันเนยเป็นโปรตีนที่สามารถไปเคลือบปกป้องบริเวณผนังเซลล์ได้ และนอกจากนั้นมีคุณสมบัติที่ช่วยป้องกันผนังเซลล์ไม่ให้เกิดการเสียหายในระหว่างการทำแห้ง โดยจะช่วยให้การเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก (Carvalho *et al*, 2004) ในการทดลองนี้จะเลือกใช้สารสกัดจากข้าวโพดเป็นสาร cryoprotectant เนื่องจากสามารถส่งเสริมการรอดชีวิตได้ดีรองจากน้ำตาลซูโครส และการใช้สารสกัดจากข้าวโพดเป็น cryoprotectant นั้นเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ซินไบโอติกด้วย

A B



C

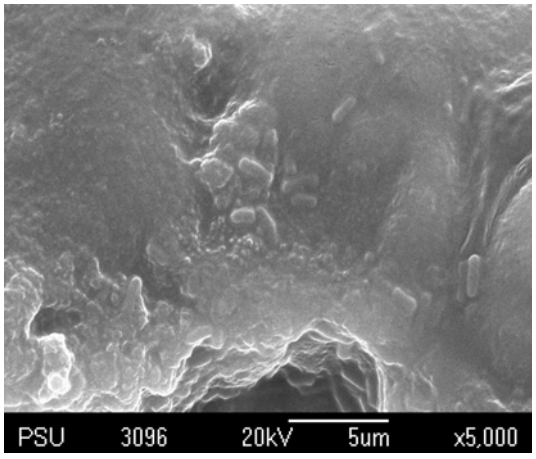


Figure 15. Scanning electron micrograph (SEM) of *Lactobacillus plantarum* after freeze-drying with sucrose (A) skim milk (B) and corn extract (C) as cryoprotectants.

6. การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในสภาวะที่เลียนแบบทางเดินอาหารส่วนต้น

6.1 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในสภาวะที่เป็นกรด

นำ *L. plantarum* TISTR 875 ที่ผ่านการทำแห้ง (มีการเลี้ยงในอาหารที่สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน เติม crude fiber จากถั่วเขียวตะกอนละเอียด พีเอช 6.5 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้น้ำตาลซูโครสและสารสกัดจากข้าวโพดเป็นสาร cryoprotectant) ละลายลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย Phosphate buffer saline ที่มี pH เท่ากับ 2, 3, 4 และ 5 (โดยใช้ 8 M HCl) โดยใช้เชื้อ *L. plantarum* TISTR 875 ที่ไม่ผ่านการทำแห้งมาเปรียบเทียบ (เลี้ยงในอาหาร MRS ปกติที่ไม่มีการเติมสารสกัดและcrude fiber จากธัญพืช) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง เพื่อนับจำนวนเซลล์โปรไบโอติกที่รอดชีวิต พบว่า *L. plantarum* ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการทำแห้งมีการรอดชีวิตที่ลดลงอย่างรวดเร็วที่พีเอช 2 (Figure 16.) โดยการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสาร cryoprotectant จากเริ่มต้นเซลล์ที่ผ่านการทำแห้ง 7.03 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง เซลล์ลดลงเหลือ 3.21 log CFU/มิลลิลิตร และเมื่อครบ 4 ชั่วโมง เซลล์ลดลงเหลือ 1.12 log CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์อิสระนั้นมีเซลล์เริ่มต้น 6.90 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมงนั้น ไม่พบจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตเลย (Figure 16A.) ซึ่งให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันกับการใช้สารสกัดจากข้าวโพดเป็นสาร cryoprotectant ซึ่ง พบว่าเซลล์เริ่มต้นที่ผ่านการทำแห้ง 7.90 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 1 ชั่วโมง เซลล์ลดลงเหลือ

3.54 log CFU/ มิลลิลิตร และเมื่อครบ 4 ชั่วโมง เซลล์ลดลงเหลือ 2.12 log CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่เซลล์อิสระนั้นมีเซลล์เริ่มต้น 7.83 log CFU/มิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมงนั้น ไม่พบจำนวนเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตเลย ส่วนในสภาวะของพีเอช 3, 4 และ 5 นั้น เซลล์ทั้งแบบที่ผ่านการทำแห้งและเซลล์อิสระนั้นไม่มีการลดลงของเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง นั่นแสดงให้เห็นว่าการเติมสารสกัดถั่วเหลือง และ crude fiber จากถั่วเขียวตะกอนละเอียดลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ และใช้สารสกัดจากข้าวโพดเป็นสาร cryoprotectant แล้วนำไปทำแห้งช่วยเสริมให้มีการรอดชีวิตของเชื้อเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดได้ดีกว่าเซลล์อิสระ แต่เมื่อพิจารณาในส่วนของสาร cryoprotectant จะเห็นว่า การใช้สารสกัดจากข้าวโพดและน้ำตาลซูโครสให้ผลการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกันในสภาวะที่เป็นกรด แสดงว่าการใช้สาร cryoprotectant ไม่ส่งผลต่อการเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกในสภาวะที่เป็นกรด แต่เป็นการเติมสารสกัดจากถั่วเหลืองและตะกอนของถั่วเขียวในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นตัวเพิ่มการรอดชีวิตของโปรไบโอติกเนื่องจากสารทั้งสองชนิดนั้นมีคุณสมบัติในการไม่ถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารตอนต้นซึ่งมีทั้งสภาพที่เป็นกรดและเป็นด่าง ดังเช่นการทดลองของ Michida และคณะ (2006) มีการใช้สารพรีไบโอติกจากธัญพืช ได้แก่ ข้าวมอลต์ และบาร์เล่ย์ เป็นตัวตรึงเซลล์เพื่อช่วยเคลื่อนย้ายโปรไบโอติกที่ต้องผ่านทางเดินอาหารส่วนต้นที่มีทั้งกรดและเกลือน้ำดีไปสู่ลำไส้ใหญ่ โดย free cell ของ *Lactobacillus plantarum* ผ่านสภาวะที่เสมือนน้ำย่อยในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 30 นาที ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มี 7.24 log CFU/มิลลิลิตร จะลดลงเหลือ 1.92 log CFU/มิลลิลิตร แต่เมื่อตรึงเซลล์ด้วย barley fiber ในสภาวะเดียวกันที่เวลา 30 นาทีปรากฏว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มี 7.24 log CFU/มิลลิลิตร จะลดลงเหลือ 5.1 log CFU/มิลลิลิตร ด้วยเหตุผลที่ว่าสารที่เป็น fiber นั้นมีลักษณะเป็นรูพรุน ช่วยในการฝังตัวของเซลล์ ดังเช่นใน Figure 15. จึงช่วยป้องกันเซลล์จากการทำลายของสภาวะที่เป็นกรดได้

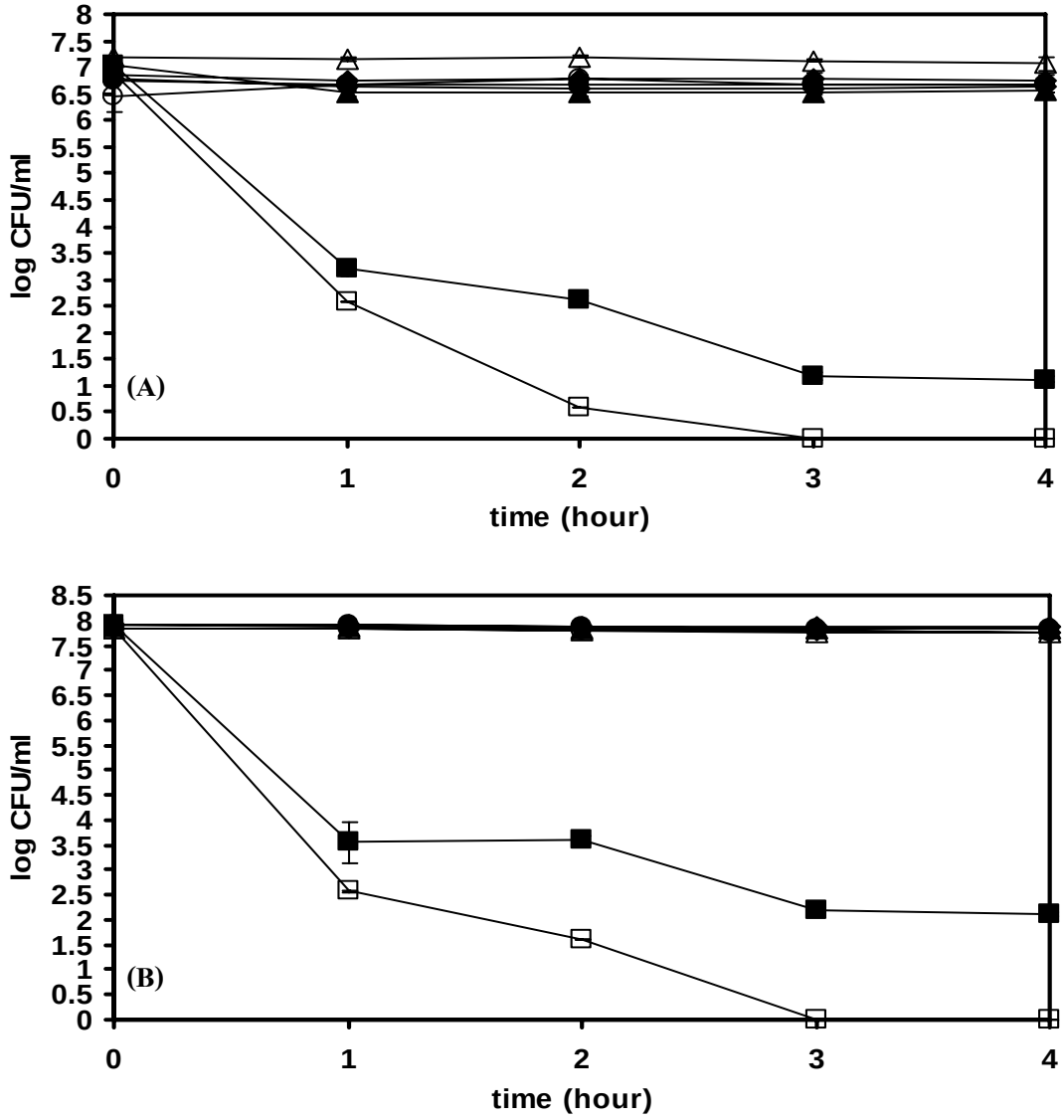


Figure 16. Cell reduction of freeze-dried *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 with sucrose (A), corn extract (B) as cryoprotectant (closed symbols) and free cell (opened symbols) in acidic condition with pH 2 (■,□),3 (▲,△), 4 (●,○) and 5 (◆,◇).

6.2 การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งในสภาวะที่เป็นเกลือน้ำดี

นำ *L. plantarum* TISTR 875 ที่ผ่านการทำแห้ง (มีการเลี้ยงในอาหารที่สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน เติม crude fiber จากถั่วเขียวตะกอนละเอียด พีเอช 6.5 เลี้ยงที่อุณหภูมิ37 องศาเซลเซียสเก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้น้ำตาลซูโครสและสารสกัดจากข้าวโพดเป็นสาร cryoprotectant) ละลายลงในหลอดทดลองที่มี 3.0 เปอร์เซ็นต์ Bile salt ที่มีพีเอชเท่ากับ 8 (โดยใช้ 0.1 M NaOH) โดยใช้เชื้อ *L. plantarum* TISTR 875

ที่ไม่ผ่านการทำแห้งมาเปรียบเทียบ (เลี้ยงในอาหาร MRS ปกติที่ไม่มีการเติมสารสกัดและcrude fiber จากธัญพืช) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 0 และ 4 ชั่วโมง เพื่อนับจำนวนเซลล์โปรไบโอติก ที่รอดชีวิต พบว่า *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 ทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการทำแห้งไม่มีการลดลงของจำนวนเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นเกลือน้ำดี เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และการใช้น้ำตาลซูโครสและสารสกัดจากข้าวโพดเป็นสาร cryoprotectant ก็ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน (Figure 17.) เนื่องด้วยเชื้อที่ใช้นั้นเป็นโปรไบโอติกซึ่งคุณสมบัติในการทนต่อเกลือน้ำดีอยู่แล้ว การเติมสารสกัดจากถั่วเหลือง การติม crude fiber จากถั่วเขียวชนิดละเอียดและการเติมสาร cryoprotectant จึงไม่มีผลต่อการทดลองในส่วนนี้

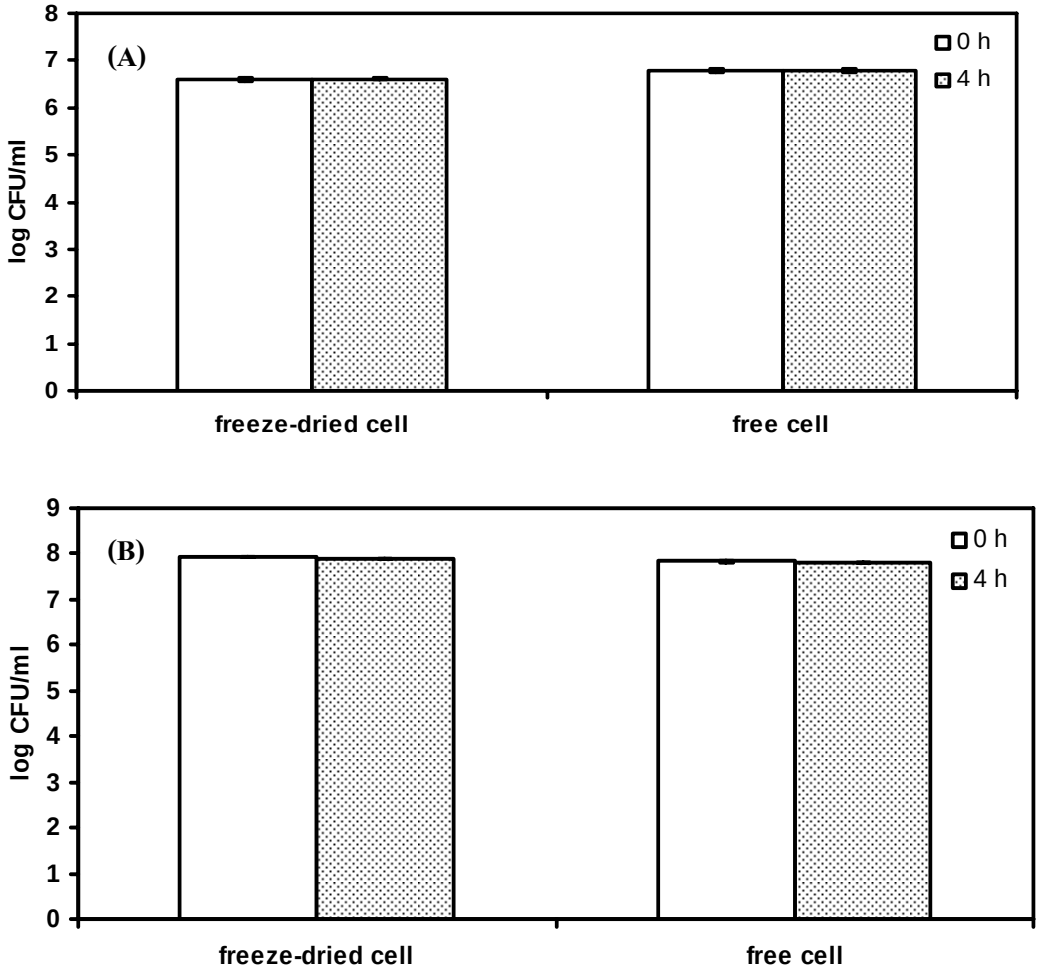


Figure 17. Number of freeze-drying *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 with sucrose (A), corn extract (B) as cryoprotectant and free cell in 3 % bile salt condition with pH 8 at 0 and 4 hours.

7. การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเมื่อเก็บรักษาในอุณหภูมิและบรรจุภัณฑ์ที่แตกต่างกัน

L. plantarum ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารที่สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน เติม crude fiber จากถั่วเขียวตะกอนละเอียด พีเอช 6.5 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้น้ำตาลซูโครสและสารสกัดจากข้าวโพดเป็นสาร cryoprotectant นำเซลล์ผงมาบรรจุในถุงลามิเนตในสภาวะสุญญากาศ และบรรจุในขวดแก้วมีการเติมก๊าซไนโตรเจนลงไป แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดยเก็บตัวอย่างทุก 2 อาทิตย์ เพื่อดูการรอดชีวิตและปริมาณความชื้นที่เกิดขึ้น พบว่า *L. plantarum* ที่เก็บรักษาในถุงลามิเนตมีการรอดชีวิตที่ดีกว่าการเก็บรักษาในขวดแก้ว ในการเก็บรักษาทั้งสองอุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ที่เวลา 8 สัปดาห์ เชื้อที่เก็บในถุงลามิเนตมีการลดลง 0.84 log CFU/มิลลิลิตร ส่วนเชื้อที่เก็บในขวดแก้วมีการลดลง 1.17 log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้น 6.54 และ 12.51 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง เชื้อที่เก็บในถุงลามิเนตมีการลดลง 5.18 log CFU/มิลลิลิตร ส่วนเชื้อที่เก็บในขวดแก้วมีการลดลง 6.37 log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้น 15.56 และ 18.78 เปอร์เซ็นต์ (Figure 18.) เมื่อเปรียบเทียบกันในส่วนของอุณหภูมิ พบว่า การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส มีการรอดชีวิตของเชื้อดีกว่า การเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งอุณหภูมิที่สูงกว่ามีผลต่อปริมาณความชื้นที่สูงขึ้น ซึ่งปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการลดลงของจำนวนเชื้อ และเมื่อพิจารณาในส่วนของภาชนะที่ใช้บรรจุ พบว่า การเก็บรักษาในถุงลามิเนตมีการรอดชีวิตที่ดีกว่าการเก็บรักษาเชื้อในขวดแก้ว เนื่องจากว่าภาชนะที่เป็นขวดแก้วที่ใช้นั้นเป็นแบบฝาเกลียวจึงมีการส่งผ่านของออกซิเจนจากภายนอกสู่ภายในภาชนะบริเวณรอยเชื่อมต่อของฝาได้ดีกว่าถุงลามิเนตซึ่งมีการเคลือบถึง 3 ชั้น เป็นผลให้ปริมาณความชื้นของเชื้อที่บรรจุในขวดแก้วสูงกว่าความชื้นของเชื้อที่บรรจุในถุงลามิเนตที่อยู่ในสภาวะสุญญากาศ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองที่มีการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสาร cryoprotectant เมื่อเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในถุงลามิเนตที่ 5 องศาเซลเซียสให้การรอดชีวิตของเชื้อดีกว่าการเก็บในขวดแก้วที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิห้อง (Figure 19.) แต่การใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสาร cryoprotectant นั้น ความชื้นเริ่มต้นจะต่ำกว่าการใช้สารสกัดจากข้าวโพดเป็น cryoprotectant ส่งผลให้การลดลงของเชื้อเมื่อสัปดาห์ที่ 8 น้อยกว่า โดยเชื้อลดลง 0.33 log CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่การใช้สารสกัดจากข้าวโพดเป็นสาร cryoprotectant มีการลดลงของเชื้อ 0.84 log CFU/มิลลิลิตร

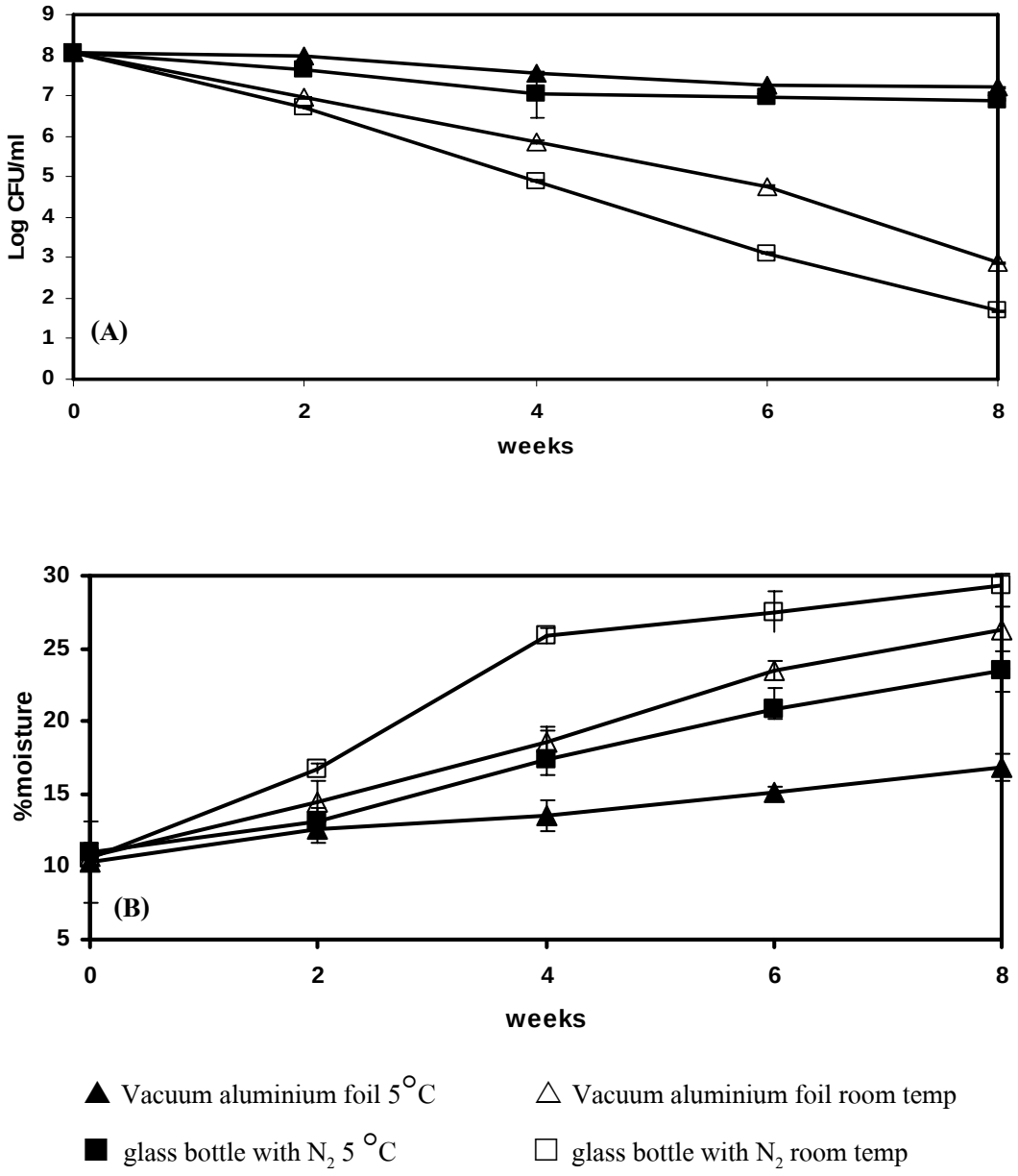


Figure 18. Viable population (A) and moisture content (B) of freeze-drying *Lactobacillus plantarum* with corn extract as cryoprotectant stored in vacuum aluminium foil and glass bottle with N_2 at 5°C and room temperature.

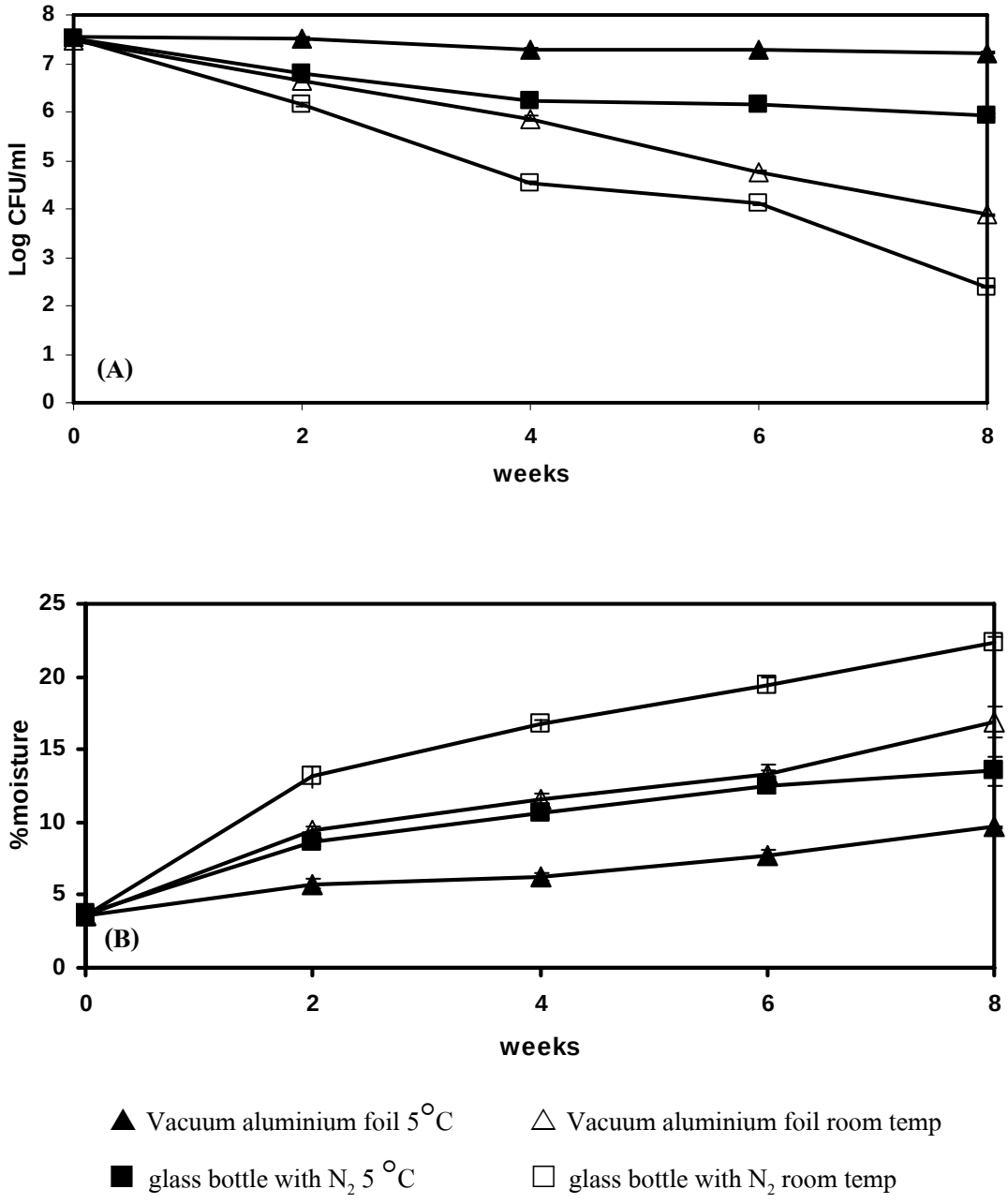


Figure 19. Viable population (A) and moisture content (B) of freeze dried *Lactobacillus plantarum* with sucrose as cryoprotectant stored in vacuum aluminium foil and glass bottle with N_2 at 5°C and room temperature.

หลังจากการทำแห้งแล้วผลิตภัณฑ์ที่ได้ควรเก็บรักษาไว้ในสภาวะที่เหมาะสม เพื่อให้เชื้อมีการรอดชีวิตสูง ดังนั้นสภาวะที่จะทำให้เชื้อมีการรอดชีวิตต่ำเช่น ออกซิเจน ความชื้น แสง การปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ และ อุณหภูมิ ควรหลีกเลี่ยง ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้การเก็บรักษาเชื้อหลังการทำแห้งไว้ในถุงลามิเนตจึงมีความเหมาะสมเนื่องจากถุงลามิเนตจะมีอัตราการซึมผ่านของอากาศต่ำกว่าภาชนะบรรจุอื่น ๆ เช่น ขวดพลาสติก หรือ ขวดแก้ว (Ishibashi and Shimamura, 1993) นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิในการเก็บรักษาเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์มากที่สุด เนื่องจากการทดลองจะพบว่าการเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำ ๆ เช่นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสจะทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตที่สูงกว่าการเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Costa และคณะ (2002) ที่พบว่า *Pentoea agglomerans* ที่เก็บรักษาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส มีปริมาณเชื้อลดลงเพียง 0.5 log CFU/มิลลิลิตร ที่เวลาการเก็บรักษา 90 วัน ในขณะที่เก็บรักษาไว้ที่ 25 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณเชื้อที่ลดลง 3 log CFU/มิลลิลิตร ที่เวลาการเก็บรักษา 28 วัน และ Saarela และคณะ (2006) พบว่า *Bifidobacterium* sp. ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ จะมีการรอดชีวิตหลังการทำแห้งสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ในการทดลองครั้งนี้ การเก็บรักษาเชื้อในถุงลามิเนตสภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จึงมีความเหมาะสมที่สุด

8. การรอดชีวิตของโปรไบโอติกที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งเมื่อนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มทางการค้า

L. plantarum ที่ผ่านการเลี้ยงในอาหารที่สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนเติม crude fiber จากถั่วเขียวตะกอนละเอียด พีเอช 6.5 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บเกี่ยวเซลล์ที่เวลา 24 ชั่วโมง และทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งโดยใช้สารสกัดข้าวโพดเป็นสาร cryoprotectant นำเซลล์ผงมาละลายด้วยนมสด และน้ำส้มพาสเจอไรซ์ มีเชื้อเริ่มต้น 7.31 และ 7.23 log CFU/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส สังเกตการณ์เปลี่ยนของจำนวนเซลล์และพีเอชเป็นเวลา 6 สัปดาห์ ดัง Figure 19. พบว่า ในผลิตภัณฑ์นมพาสเจอไรซ์ เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 6 มีปริมาณเชื้อลดลงจากเดิม 0.44 log CFU/มิลลิลิตรในขณะที่ผลิตภัณฑ์นมพาสเจอไรซ์มีเชื้อลดลงจากเดิม 0.35 log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งในผลิตภัณฑ์นมยังตรวจพบการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ในนมนอกจากเชื้อโปรไบโอติกที่เติมลงไป แต่การเจริญค่อนข้างคงที่ ในขณะที่ในผลิตภัณฑ์น้ำส้มไม่พบการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นเนื่องจากพีเอชของผลิตภัณฑ์ที่ต่ำ (4.07) และเมื่อระยะเวลาผ่านไปพีเอชในน้ำส้มลดลงเล็กน้อย แต่ในน้ำนมพีเอชลดลงจาก 6.52 เป็น 5.95 ถึงแม้ว่าจะเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แต่ในการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำเชื้อ

แบคทีเรียแลคติกยังคงสามารถมีกิจกรรมในการสร้างกรดแลคติกส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลงได้ (Shah *et al*., 1995) ลักษณะของน้ำนมเมื่อเวลาผ่านไปมีการเปลี่ยนแปลงเป็นข้นหนืดและมีการตกตะกอน ผลิตภัณฑ์น้ำส้มมีการเปลี่ยนแปลงสีเล็กน้อยเมื่อเวลาผ่านไป เมื่อเปรียบเทียบการเติมเชื้อในผลิตภัณฑ์นมกับผลิตภัณฑ์น้ำส้มพาสเจอไรซ์ พบว่า การเติมเชื้อในผลิตภัณฑ์น้ำส้มสามารถรอดชีวิตได้นานและลักษณะของผลิตภัณฑ์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่ามากเมื่อเทียบกับการกเติมเชื้อในผลิตภัณฑ์นมซึ่งเก็บรักษาได้เพียง 4 สัปดาห์ก็เกิดการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ไปจากรูปแบบเดิม ในขณะที่การเติมเชื้อในน้ำผลไม้นั้นสามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้นานกว่าและมีปริมาณของเชื้อที่มีประโยชน์เหลืออยู่เพียงพอต่อการเกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภค นอกจากนี้มีการศึกษาของ ศริสา ทวีแสง (2548) โดยการเติมเชื้อโปรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* และ เชื้อผสมระหว่าง *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* .ในน้ำส้ม น้ำสับปะรด และน้ำมะเขือเทศ ที่เก็บในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่า ในเวลา 21 วัน ปริมาณเชื้อมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น ซึ่งการเติม *Lactobacillus acidophilus* ในน้ำสับปะรดและน้ำมะเขือเทศ มีการรอดชีวิตสูงที่สุด แต่การเหลือรอดชีวิตของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* ในผลิตภัณฑ์น้ำส้มเท่ากับ 2.16 log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาณน้อยมากต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐานในระดับที่มีประโยชน์ต่อร่างการ ซึ่งต้องมีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหลือรอดชีวิตในผลิตภัณฑ์อย่างน้อย 6 log CFU/มิลลิลิตร นอกจากนี้ยังมีการนำเชื้อในรูปแบบแห้งเติมลงในผลิตภัณฑ์อื่นๆด้วย ดังเช่นการทดลองของ Saarela และคณะ (2006) ศึกษาการใช้ ไฟเบอร์ของแอปเปิ้ล ข้าวโอ๊ต wheat dextrin, polydextroseและ อินนูลิน เป็นตัวพยุงเซลล์ในการทำแห้งแบบ freeze-drying เปรียบเทียบกับการใช้ ซูโครสเป็นตัวพยุง พบว่า *Lactobacillus rhamnosus* ที่ตรึงอยู่ในตัวพยุงที่เป็นwheat dextrin และ polydextrose มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าตัวพยุงชนิดอื่น หลังจากผ่านการ freeze-drying หลังจากนั้นคัดเลือกตัวพยุงที่ให้การรอดชีวิตของ *L. rhamnosus* ดีที่สุดมา 4 ชนิด คือ sucrose, oat flour 20% β-glucan, wheat dextrin และ polydextrose มาเติมในน้ำแอ็ปเปิ้ล และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 และ 20 องศาเซลเซียส พบว่า oat flour 20% β-glucan ให้ผลการรอดชีวิตของ *L. rhamnosus* ได้ดีที่สุด ทั้งสองอุณหภูมิที่เก็บรักษาน้ำแอ็บเปิ้ล

อายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของเชื้อโพรไบโอติกที่เก็บรักษาโดยการแช่เย็นจะอยู่ในช่วง 3 – 6 สัปดาห์ ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการเก็บรักษาโดยการแช่เย็นจะมีความคงตัวของเชื้อโปรไบโอติกมากกว่าผลิตภัณฑ์ที่เก็บรักษาโดยไม่ได้แช่เย็น ส่วนอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ที่เติมเชื้อในลักษณะแห้ง จะประมาณ 12 เดือน แต่อย่างไรก็ตามการรอดชีวิตของโปรไบโอติกอาจลดลงได้ระหว่างระยะเวลาเก็บรักษา (Lori, 2001)

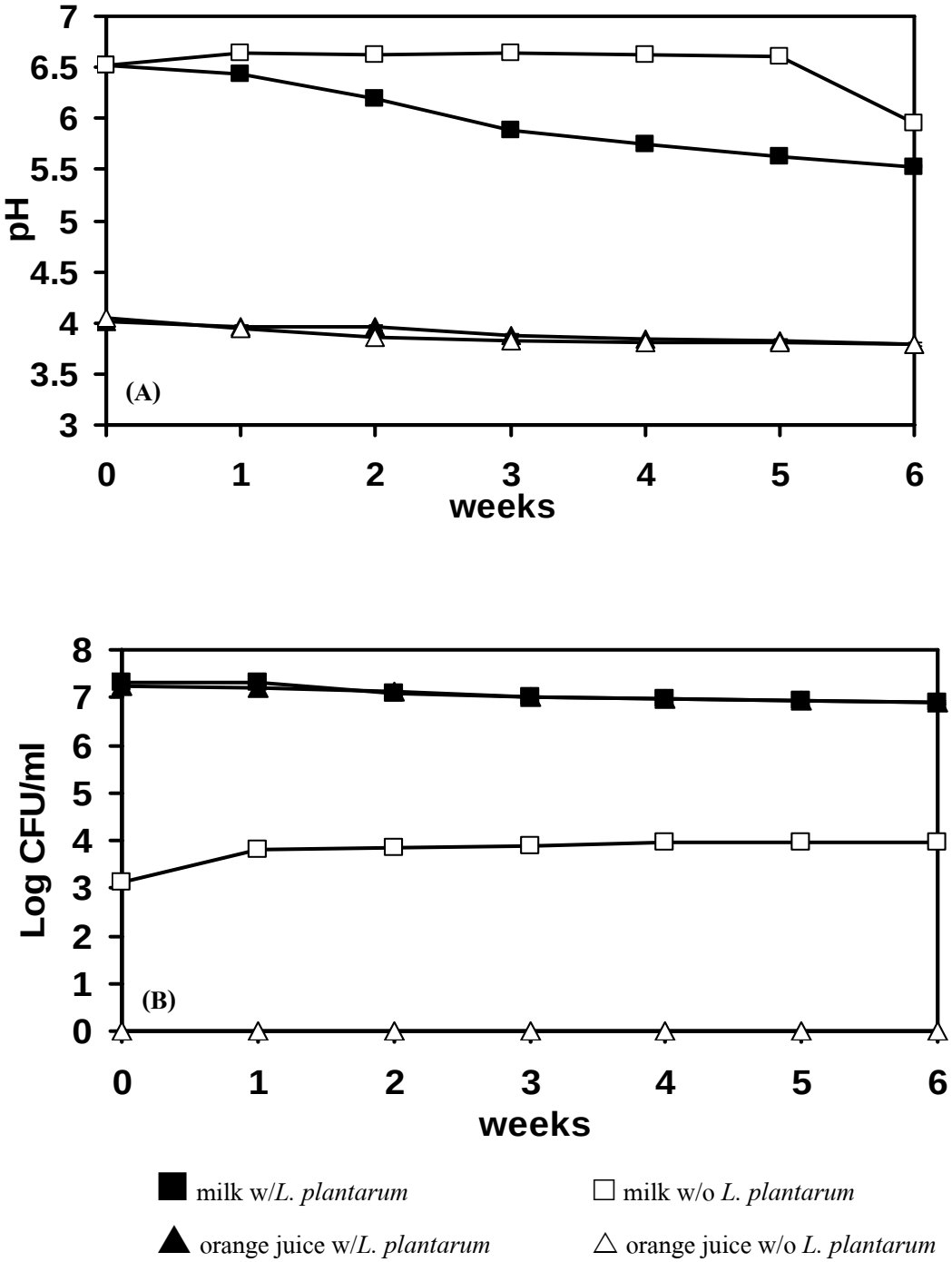


Figure 20. Change of pH (A) and viable cell counts (B) in pasteurized milk and orange juice with and with out freeze dried *Lactobacillus plantarum* addition during 6 weeks storage at 5°C.

บทที่ 4

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

โปรไบโอติก 4 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034, *Bifidobacterium longum* DSM 20215 และ *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456 มาทำการแช่แข็งที่สภาวะต่างกัน คือ -20, -80 และ -196 (ไนโตรเจนเหลว) องศาเซลเซียส นำไปทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง หลังจากนั้นตรวจสอบการรอดชีวิตหลังจากการทำแห้ง โดยดูจากการลดลงของเซลล์หลังการทำแห้งซึ่งให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 มีการรอดชีวิตสูงที่สุดเมื่อผ่านการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวก่อนทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยมีการลดลงของเซลล์หลังการทำแห้ง 0.18 log CFU/มิลลิลิตร หลังจากนั้นจึงใช้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 ไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

จากการศึกษาผลของสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 หลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยเริ่มจาก การนำสารสกัดจากธัญพืช 3 ชนิด คือ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และข้าวโพด ซึ่งผ่านการสกัดด้วยน้ำมาใช้ศึกษาในส่วนของการเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถส่งเสริมการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 หลังการทำแห้งได้ดี มีการลดลงของเซลล์ 0.11 log CFU/มิลลิลิตร และจากการสกัดสารจากธัญพืชส่วนของตะกอนที่เหลือ ก็คือ crude fiber นำมาเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นสารตัวกลางในการพยุงเซลล์ พบว่า การเติม crude fiber จากถั่วเขียวตะกอนละเอียด ช่วยให้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 มีการลดลงของเซลล์หลังการทำแห้งน้อยกว่า การไม่เติม crude fiber โดยเซลล์ลดลง 0.25 และ 0.51 log CFU/มิลลิลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.5 และการวางเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนั้น เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและช่วยให้เชื้อมีการรอดชีวิตที่ดีหลังจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

นอกจากปัจจัยของสภาวะในการเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 หลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งแล้ว ระยะการเจริญของเชื้อที่ใช้สำหรับเก็บเกี่ยวเซลล์ก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่ง จากการการทดลองศึกษา ระยะการเจริญของเชื้อ 3 ระยะ คือ late log phase, mid stationary phase และ late stationary phase ซึ่งพบว่าให้ผลการลดลงของเชื้อหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่เลือกเก็บเกี่ยวเซลล์ที่ระยะ mid

stationary phase ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อมีปริมาณสูงกว่าระยะอื่น หลังจากนั้นทำการศึกษาถึงชนิดของสาร cryoprotectant ที่ส่งเสริมให้เชื้อมีการรอดชีวิตดีที่สุดหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ซึ่งสารที่ใช้ ได้แก่ นมพร่องมันเนย (skim milk), ซูโครส, Fructo-oligosacchrides (FOS), สารสกัดถั่วเหลือง, crude fiber ถั่วเหลือง, สารสกัดข้าวโพด, crude fiber ข้าวโพด, สารสกัดถั่วเขียว, crude fiber ถั่วเขียว A,B และ EPSs ซึ่งจากการลดลงของเซลล์หลังการทำแห้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยการใช้ซูโครสเป็นสาร cryoprotectant ให้การลดลงของเชื้อหลังการทำแห้งน้อยที่สุด เท่ากับ 0.19 log CFU/มิลลิลิตร และสารสกัดจากข้าวโพดเป็นสาร cryoprotectant ให้การลดลงของเชื้อหลังการทำแห้งน้อยที่สุดรองลงมา เท่ากับ 0.26 log CFU/มิลลิลิตร

จากการทดลองดังที่กล่าวมาข้างต้นจะได้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 ชนิดผง ที่ผ่านการเลี้ยงด้วยอาหาร MRS ดัดแปลงที่มีการใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอน มีการเติม crude fiber จากถั่วเขียวชนิดละเอียด พีเอชอาหาร 6.5 ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ มีการเติมสารสกัดจากข้าวโพด เป็นสาร cryoprotectant เพื่อเป็นผลิตภัณฑ์ซินไบโอติก แล้วจึงนำไปแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว ต่อไปก็เข้าสู่กระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง ได้ผลิตภัณฑ์ออกมาในรูปแบบผง

ผลิตภัณฑ์ที่ได้นำมาทดสอบการทนต่อสภาวะกรดและเกลือน้ำดี พบว่า สามารถทนต่อสภาวะกรดที่พีเอช 2 ได้ดีกว่าเซลล์อิสระที่เลี้ยงด้วยอาหาร MRS ปกติและไม่มีการทำแห้ง ส่วนในภาวะที่เป็นเกลือน้ำดีนั้นสามารถทนได้เช่นกัน และไม่มีการลดลงของเซลล์ในระยะเวลา 4 ชั่วโมง เช่นเดียวกับเซลล์อิสระ นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้นำมาบรรจุในถุงลามิเนตสภาวะสุญญากาศ และในขวดแก้วที่มีการเติมก๊าซไนโตรเจน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง พบว่า การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ในถุงลามิเนตสภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมมากที่สุด เพราะว่ามีการลดลงของเซลล์ 0.84 log CFU/มิลลิลิตร ซึ่งน้อยกว่าวิธีการที่เหลือเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ในขณะเดียวกันการเติมผลิตภัณฑ์ในรูปแบบแห้งในผลิตภัณฑ์นมสดและน้ำส้มพาสเจอไรซ์ ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่า การเติมเชื้อทั้งในน้ำนมและน้ำส้มสามารถคงตัวอยู่ได้นานถึง 6 สัปดาห์ โดยที่ผลิตภัณฑ์น้ำส้มมีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด และมีการลดลงของเชื้อ 0.35 log CFU/มิลลิลิตร ในขณะที่การเติมเชื้อในนมสดมีการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ในสัปดาห์ที่ 4 ซึ่งปริมาณเชื้อที่เหลืออยู่ในน้ำส้มและน้ำนมนั้นเพียงพอที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายผู้บริโภค ซึ่งกำหนดไว้ว่าต้องมีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในผลิตภัณฑ์อย่างน้อย 6 log CFU/มิลลิลิตร

เอกสารอ้างอิง

จารุวรรณ ยุวเสถียร และตรีทิพพา เลาหประภานนท์. 2541. การแยกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากอาหารหมัก. โครงงานนักศึกษา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ธารารัตน์ ศุภศิริ. 2542. PROBIOTIC. ว.แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ 53: 357-360.

นันทินา เชิญทอง. 2550. การคัดเลือก ลักษณะ และคุณสมบัติความเป็นพรีไบโอติกของเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์จากแบคทีเรียแลคติกจากสัตว์ทะเล. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิรัญญา บุญติ้น. 2550. การคัดเลือกโปรไบโอติกจากสัตว์ทะเล และการใช้สารสกัดจากพืชหัวเป็นพรีไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นวลจันทร์ พารักษา. 2533. สาระน่ารู้เกี่ยวกับโปรไบโอติก. ว.สุกรสาส์น 16: 6-13.

ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล. 2547. เทคโนโลยีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ตอนที่ 1). ว.สมาคมเครื่องทำความเย็นไทย. 11: 20-22.

พิณทิพย์ รัมภกาภรณ์ และ สุดสาย ตรีวาณิช. 2533. คุยกันฉันเพื่อนขอ Bifidobacteria เป็นตัวเอก. ว.อุตสาหกรรมเกษตร 3: 61-66.

ภวัต สังขวัฒนะ. 2544. การพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักคล้ายโยเกิร์ตโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์โปรไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2541. โปรไบโอติก อาหารสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์ (ตอนที่1). จาร์พา 41: 50-51.

วรารัตน์ วงศ์ศุภชาติ. 2551. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตเอ็กโซโพลีแซคคทร์ไรด์จากอาหารหมักพื้นบ้านและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิยาลัยสงขลานครินทร์.

วาสนา กิตติกนกรัตน์. 2546. การศึกษาและอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ *Bacillus subtilis* TISTR001. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ศริสา ทวีแสง. 2548. การเหลือรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกในน้ำผลไม้ชนิดต่างๆ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

โสภา บิลละโสย. 2551. การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติพรีไบโอติกของสารสกัดจากพืชตระกูลถั่ว. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อุทัย คันโธ. 2535. หลักการโปรไบโอติกในเชิงอาหารสัตว์. ว.สุกรสาส์น 18: 11-16.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis of the Association of Office Analytical Chemists. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists. Inc, Artination, Virginia.

Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanaka, H., Akimoto, M., Kanai, S. and Miki, T. 1998. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. J. Food Sci. 63: 544-547.

Asahara, T., Nomota, K., Shimizu, K., Watanuki, M. and Tanka, R. 2001. Increased resistance of mice to *Salmonella typhimurium* infection by synbiotic administration of bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. J. Appl. Microbiol. 91: 985-996.

Ballongue, J., Schumann, C. and Quignon, P. 1997. Effects of lactulose and lactinol on colonic microflora and enzymatic activity. Scand. J. Gastroentero. Suppl. 222: 41-44.

Bielecka, M., Biedrzycka, E. and Majkowska, A. 2002. Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their *in vivo* effectiveness. Food Res. Int. 35: 125-131.

Boumahdi, M., Mary, P. and Hornez, J. P. 1999. Influence of growth phases and desiccation on the degrees of unsaturation of fatty acids and the survival rates of rhizobia. J. Appl. Microbiol. 87: 611-619.

Bruno, F. A., and Shah, N. P. 2002. Growth, viability and activity of *Bifidobacterium* spp. In skim milk containing prebiotics. J. Food Sci. 67: 2740-2744.

Buke, M. L. and Gilliland, E. S. 1990. Comparisons of freshly isolated strains of *Lactobacillus acidophilus* of human intestinal origin for ability to assimilate cholesterol during growth. J. Dairy Sci. 77: 2925 - 2933.

Bxcommerce. 2001. What is inulin ? (online). Available http://www.stonyfield.com (2007. July 15)

Capela, P., Hay, T. K. C. and Shah, N. P. 2006. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Res. Int. 39: 203-211.

Carvalho, A. S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F. X. and Gibbs, P. 2004. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. Int. Dairy. J. 14: 835-847.

Charalampopoulod, D.,Wang, R., Pandiella, S. S. and Webb, C. 2000. Application of cereal and cereal composition in functional food : a review. Int. J. Food Microbiol. 79: 131-141.

Conway, P. L., Corback, S. L. and Goldin, B. R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell. J. Dairy Sci. 70: 1-12.

Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F. and Stanton, C. 2004. Comparative survival of probiotic Lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotc substances. J. Appl Microbiol. 96: 1024-1039.

Costa, E., Usall, J. Teixido, N., Garcia, N. And Vinas, I. 2000. Effect of protective agents, rehydration media and initial cell concentration on viabilty of *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 subjected to freeze-drying. J. Appl. Microbiol. 89: 793-800.

Dave, R. T. and Shah, N. P. 1997. Viability of yogurt and probiotic bacteria in yogurt made from commercial starter cultures. Int. Dairy J. 7: 31-41.

Dasechel, M. A., and Klaenhammer, T. R. 1989. Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1538-1541.

Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. J. Dairy Sci. 70: 1-12.

Fooks, L. J., Fuller, R. and Gibson, G.R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. Int. Dairy J. 9: 53-61.

Fox, J. D. and Robyt, J. F. 1991. Miniaturization of three carbohydrate analysis using a microsample. Anal. Chem. 195: 93-96.

Fuller, R. 1993. Probiotic food current use and future developments. Int. Food Ingred. 3: 23-26.

Gardiner, G. E., Bouchier, P., O'Sullivan, E., Kelly, J., Collins, J. K., Fitzgerald, G. F., Ross, R. P. and Stanton, C. 2002. A spray-dried culture for probiotic cheddar cheese manufacture. Int. Daily J. 12: 749-756.

Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota : Introducing the concept of Prebiotic. Am. J. Nutr. 125: 1404-1412.

Gibson, G. R., Beatty, E. R., Wang, X. and Cumming, J. H. 1995. Selective stimulation of Bifidobacteria in the human colon by FOS and inulin. J. Dairy Sci. 108: 975-982.

Gibson, G. R., Berry, O. P. and Rastall, R. A. 2000. Prebiotic: New Development in Functional Food. Chandos Publishing, Limited. Oxford.

Gibson, G. R. 2004. Prebiotic. J. Gastroentero. Suppl. 18: 287-298.

Guillon, F., Champ, M. and Thibault, J. E. 2000. Dietary fiber function products. *In* Functional Food Concept to Product. (Gibson, G. R. and Williams, C. M., ed).p. 315-364. Wood head Publishing Limitted. Cambridge.

Hartke, A., Bouche, S., Gansel, X., Boutibonnes, P. and Auffray, Y. 1994. Starvation induced stress resistance in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. Appl. Environ. Microbial. 60: 3474-3478.

Hayakawa, K., Mizutani, J., Wada, K., Masai, T., Yoshihara, I. and Mitsuoka, T. 1990. Effects of oligosaccharides on the human Faecal flora. Microb. Ecol Health D. 3: 293-303.

Hood, S. K. and Zottola, E. A. 1988. Effect of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. J. Food Sci. 53: 1514-1516.

Ishibashi, N. and Shimamura, S. 1993. Bifidobacteria: research and development in Japan. J. Food. Technol. 47: 126-134.

Kaila, M., Isolauri, E., Soppi. E., Virtanen, E., Laine, S. and Arvilommi, H. 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human dirrhoea by a human *Lactobacillus* strain. Int. J. Ped. Res. 32: 141-144.

Kim, Y. and Wang, S. S. 2002. Physiochemical properties of inulin in baking as a fat substitute (online). Available http://www.confex.com. (2007. July 15)

Kontula, P. 1998. The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on fermented oat bran product: effect on gastrointestinal microbiota. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 246-252.

Kolida, S., Tuohy, K. and Gibson, G. R. 2002. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. Brit. J. Nutr. 87: S193-S197.

Lankaputhra, W. E. V, Shah, N. P. and Britz, M. L. 1996. Evaluation of media for selected enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. Food. Aust. 48: 113-118.

Lee, Y. K. and Salminen, S. 1995. The coming of age of probiotics. Trends. Food Sci. Tech. 6: 241-245.

Lee, H. W., Park, Y. W., Jung, J. S. and Shin, W. S. 2002. Chitosan oligosaccharides, dp 2-8, have prebiotic effect on the *Bifidobacteria bifidium* and *Lactobacillus* sp. Food Microbiol. 8: 319-324.

Lopez, H. W., Coudray, C., Levrat-Verny, M. A., Coudray, F. C., Demigne, C. and Remesy, C. 2000. Fructo-oligosaccharides enhance miniral absorption and counteract the deleterious effects of phytic acid on mineral homeostasis in rats. J. Nutr. Biochem. 11: 500-508.

Lori, K., 2001. Prophylactic and therapeutic use of probiotic: A review. J. Am. Diet. Assoc. 101: 229-238.

Mary, P., Oching, D. and Tailliez, R. 1986. Growth status of rhizobia in reiation to their tolerance to low water activities and desiccation stresses. Soil. Biol. Biochem. 18: 179-184.

Martinez-Villaluenga, C., Frias, J. and Vidal-Valverde, C. 2005. Raffinose family oligosaccharides and sucrose contents in 13 Spanish lupin cultivars. Food Chem. 91: 645-649.

Michida, H., Tamalampudi, S., Pandiella, S. S., Webb, C., Fukuda, H. and Kondo, A. 2006. Effect of cereal extracts and cereal fiber on viability of *Lactobacillus plantarum* under gastrointestinal tract conditions. Biochem. Eng J. 28: 73-78.

Naidu, A. S., Bidlack, W. R., and Clemens, R. A. 1999. Probiotic spectra of Lactic Acid Bacteria (LAB). Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 39: 13-126.

Ohkusa, T., Ozaki, Y., Sato, C., Mikuni, K. and Ikeda, H. 1995. Long-term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp. in human fecal flora. Microbiol. Rev. 56: 415-420.

Olano-Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. 2000. *In vitro* fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. Brit. J. Nutr. 83: 247-255.

Otero, M. C., Espeche, C. and Nader-Macias, M. E. 2007. Optimization of the freeze-drying media and survival throughout storage of freeze-dried *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus delbureckii* subsp. *delbrueckii* for veterinarian probiotic applications. Process. Biochem. 42: 1406-1411.

Palmfeldt, J. and Hahn-Hagerdal, B. 2000. Influence of culture pH on survival of *Lactobacillus reuteri* subjected to freeze-drying. Int. J. Food Microbiol. 55: 235-238.

Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Kotzekidou, P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. J. Meat Sci. 65: 859-867.

Paul, B. 1997. Effect of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine (online). Available http://medherb.com (2006. July 18)

Rastall, R. A. and Gibson, G. R. 2002. Prebiotics oligosaccharides: evaluation of biological activities and potential future developments. *In* Probiotics and Prebiotics: Where Are We Going? (Tannock, G. W., ed.). p. 107-148. Caister Academic Press. United Kingdom. London.

Reddy, B. S. 1999. Possible mechanisms by which pro- and prebiotics influence carcinogenesis and tumor growth. J. Nutr. 129: 1478S-1482S.

Renner, H. W. and Münzner, R. 1991. The possible role of probiotics as dietary antimutagens. Mutat. Res. 262: 239-245.

Rice, J. 2002. Probiotics and Prebiotics for Healthful Benefits. Food Product Design. Virgo Publishing.

Rinkinen, M., Jalava, K., Westermarck, E., Salminen, S. and Ouwehand, A. C. 2003. Interaction between probiotic lactic acid bacteria and canine enteric pathogens : a risk factor for intestinal *Enterococcus faecium* colonization. Vet. Microbiol. 92: 111-119.

Robertson, J. A., Ryden, P., Botham, R. L., Reading, L., Gibson, G. R. and Ring, S. G. 2001. Structural properties of diet-derived polysaccharides and their influence on butyrate production during fermentation. Brit. J. Nutr. 81: S219-S223.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. and Mattila-Sand-holm, T., 2000. Probiotic bacteria : safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84: 197-215.

Saarela, M., Virkajarvi, I., Nohynek, L., Vaari, A. and Matto, J. 2006. Fiber as carrier for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereal. J. Food Microbiol. 112: 171-178.

Sako, T., Matsumoto, K. and Tanaka, R. 1999. Recent progressonresearch and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. Int. Dairy J. 9: 69-80.

Schoug, A., Fischer, J., Heipieper, H. J., Schnurer, J. and Hakansson, S. 2007. Impact of fermentation pH and temperature on freeze-drying survival and membrane lipid composition of *Lactobacillus coryniformis* Si3. J. Ind. Microbiol Biotechnol. 35: 175-181.

Shah, N. P., Lankaputra, W. E., Britz, M. L. and Kyle, W. S. 1995. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during refrigerated. Int. Dairy J. 5: 515-521.

Shirota, M. 1962. *Lactobacillus* in health and disease. Yakult Honsha Co., Ltd. Japan.

Stanton, C., Gardiner, G., Lynch, P. B., Collins, J. K., Fitzgerald, G. and Ross, R. P. 1998. Probiotic Cheese. Int. Dairy J. 8: 491-496.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N., Arimuggaswany, R., Peiris, P. and Kailasaoathy, K. 2000. Encapsulation bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal condition and in yoghurt. Int. J. Food Microbiol. 62: 47-55.

Tanya, Z. 2002. The ecosystem in your gut : how prebiotic work. http://www. Dietandbody.com (2007. July 17)

Terada, A., Hara, H., Kato, S., Kimura, T., Fujimori, I., Hara, K., Maruyama, T. and Mitsuoka, T. 1993. Effect of lactosucrose on faecal flora and faecal pulrefactive product of cats. J. Vet Med. Sci. 55: 291-295.

To, B.C. S. and Etzel, M. R. 1997. Spray drying, freeze drying, or freezing of three different lactic acid bacteria. J. Food. Sci. 63: 576-585.

Toit, M. 1998. Characterization and selection of probiotic Lactobacilli for a preliminary minipig feding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moistire content. J. Food Microbiol. 40: 93-104.

Tuohy, K. M., Probert, H. M., Smejkal, C. W. and Gibson, G. R. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. Drug Discov. Today 8: 692-700.

Vandenbergh, T. B. 1993. Lactic Acid Bacteria, the metabolic product and interference with microbial growth. Fems. Microbiol. Rev. 12: 221-238.

Van Den Heuvel, E., Schafasma, G., Muys, T. and Van Dokkum, W. 1998. Nondigestible oligosaccharides do not interfere with calcium and Nonheme-iron absorption in young healthy men. J. Clinic Nutr. 67: 45-451.

Vicki, K. 2002. Inulin. A prebiotic (online). Available http://www. Stonyfield.com. (2006. July 15)

Willette, W. C., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Rosener, B. A. and Speizer, F. F. 1990. Relation of feat, fat and fiber intake to risk of colon cancer in a prospective study among women. New Engl. J. Med. 323: 1664-1672.

Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H. 1995. The lactic acid bacteria. *In* The Genera of Lactic Acid Bacteria. (Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H., ed) p. 1-6. Blackie Academic and Professional. Lon don.

Yoon, K. Y., Woodams, E. E. and Hang, Y. D. 2005. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. Lebensm. Wiss. Technol. 38: 73-75.

Zhao, G. and Zhang, G. 2005. Effect of protective agents, freezing temperature, rehydration media on viability of malolactic bacteria subjected to freeze-drying. J. Appl. Microbiol. 99: 333-338.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารเคมี

1. องค์ประกอบและการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมอาหาร De Man Rogosa Sharpe (MRS)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Proteose peptone	10	กรัมต่อลิตร
Beef extract	10	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5	กรัมต่อลิตร
Dextrose	20	กรัมต่อลิตร
Tween 80	1	มิลลิลิตรต่อลิตร
Ammonium citrate	2	กรัมต่อลิตร
Sodium acetate	5	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulphate	0.10	กรัมต่อลิตร
Manganese sulphate	0.05	กรัมต่อลิตร
Dipotassium phosphate	2	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งอาหาร 55.15 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Modified dinitrosalicylic acid

องค์ประกอบ

NaOH	10	กรัมต่อลิตร
Na_2SO_3	0.5	กรัมต่อลิตร
Sodium potassium tratrat	200	กรัมต่อลิตร
3,5-Dinitrosalicylic acid	10	กรัมต่อลิตร
Phenol	2	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง NaOH ตามปริมาณที่กำหนด ละลายในน้ำกลั่น 0.9 ลิตร จากนั้นนำส่วนประกอบที่เหลือละลายในสารละลาย NaOH ที่เตรียมไว้ คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer หลังจากนั้น นำมาปรับปริมาตรด้วยขวดปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

1.3 สารละลาย phenol ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Modified phenol sulfuric acid

Phenol	50	กรัมต่อลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่ง Phenol ตามปริมาณที่กำหนดละลายในน้ำกลั่น 0.9 ลิตร จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยขวดปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น

ภาคผนวก ข

วิธีวิเคราะห์

1. การเตรียมหัวเชื้อจุลินทรีย์

นำเชื้อโปรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์(*Lactobacillus plantarum* TISTR 875, *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1034, *Bifidobacterium longum* DSM 20215 และ *Bifidobacterium bifidum* DSM 20456) เลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ในขวดฝาปิดสนิทขนาด 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกตัวเซลล์โดยนำไปหมุนเหวี่ยง 8000×g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างตัวเซลล์ด้วยน้ำเกลือปลอดเชื้อ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร 2 ครั้ง และ เติมน้ำเกลือปลอดเชื้อ 0.85 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อทำให้เป็น suspension และเจือจางจนได้ความเข้มข้น 10^8 CFU/มล.

2. การนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

2.1 การนับจำนวนแบคทีเรียที่ไม่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying)

นำตัวอย่างเชื้อมาทำการเจือจางด้วย 0.85% น้ำหนักต่อปริมาตร ของโซเดียมคลอไรด์ จนได้ความเข้มข้น 10^6, 10^7 และ 10^8 CFU/มล. ดูดตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมา 1 มล. ทำการ pour plate ด้วยอาหาร MRS agar ที่มีการเติม bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ *Bifidobacterium* ทำการ pour plate ด้วยอาหาร MRS ที่มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและรายงานผลในรูป CFU/มล.

2.2 การนับจำนวนแบคทีเรียที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze-drying)

นำตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้ง 1 กรัม มาละลายใน 0.15% น้ำหนักต่อปริมาตรของ peptone water ปริมาตร 9 มล. ทำการผสมให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 15 วินาที ทำการเจือจางด้วย peptone water จนได้ความเข้มข้น 10^6, 10^7 และ 10^8 CFU/มล. ดูดตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมา 1 มล. ทำการ pour plate ด้วยอาหาร MRS agar สำหรับ *Bifidobacterium* ทำการ pour plate ด้วยอาหาร MRS ที่ มีการเติม L-cysteine-hydrochloride 0.05 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีการเติม bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีและรายงานผลในรูป CFU/กรัม ส่วน *Lactobacillus*

ทำการ spread plate บนบนอาหารแข็ง MRS ที่มีการเติม bromocresol purple 0.02 เปอร์เซ็นต์ (นับโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหาร MRS agar จากสีม่วงเป็นสีเหลือง)

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ Miller (1959) (Robertson *et al*., 2001)

การเตรียมตัวอย่างสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานโดยชั่งน้ำตาลกลูโคส 0.1 กรัมละลายในขวดปรับปริมาตรเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเจือจางให้ได้สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0 – 500 ไมโครกรัมต่อลิตร แล้วทำการทดลองโดยเติมสารละลายกลูโคส 100 ไมโครลิตร เติมลงในไมโครไตเตอร์เพลท แล้วเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ปิดไมโครไตเตอร์เพลท ด้วยพลาสติกใส (polyvinylchloride cling film) แล้วใส่ในถุงซิป นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานและหาสมการ

การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสมปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงในไมโครไตเตอร์เพลท แล้วเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ปิดไมโครไตเตอร์เพลทด้วยพลาสติกใส (Polyvinylchloride cling film) แล้วใส่ในถุงซิป นำไปต้มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาแทนค่าในสมการกราฟมาตรฐาน

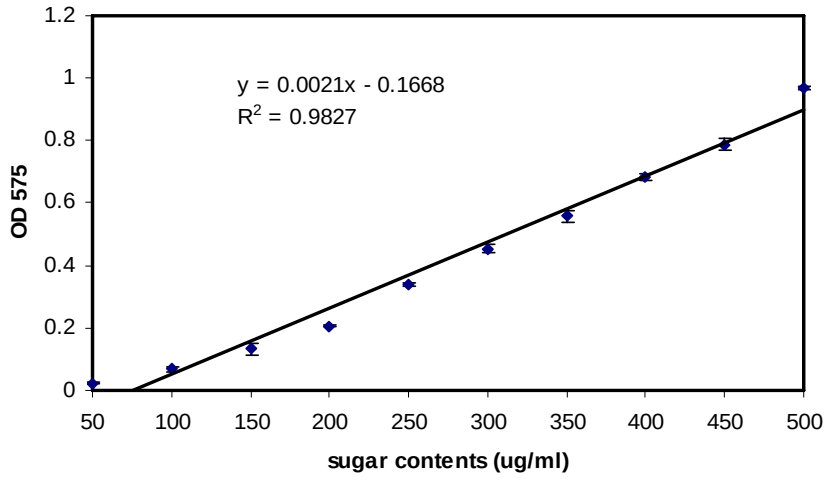


Figure 21. Standard curve of reducing sugar

4. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) โดยใช้วิธี Modified phenol sulfuric method (Fox and Robyt, 1991)

เติมตัวอย่างปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงในไมโครไตเตอร์เพลท หลังจากนั้นเติม 5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร phenol ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน (ประมาณ 30 วินาที) นำ ไมโครไตเตอร์เพลท วางบนก้อนน้ำแข็ง และเติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน (ประมาณ 30 วินาที) หุ้มไมโครไตเตอร์เพลทด้วยพลาสติกใส และนำไปใส่ใน plastic zipper bag นำไปต้มที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นและนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 492 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง ไมโครไตเตอร์เพลท เทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ได้กับกราฟมาตรฐานของกลูโคส

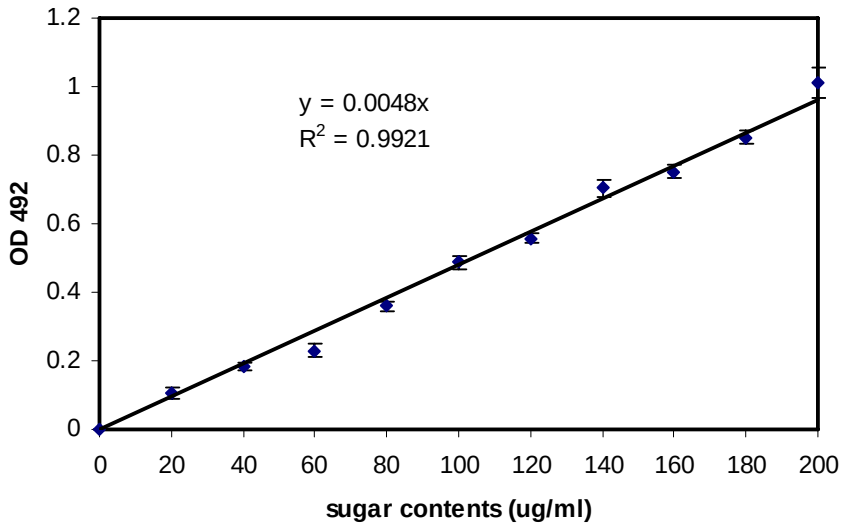


Figure 22. Standard curve of total sugar.

5. การวิเคราะห์หาปริมาณความชื้น (AOAC, 1990)

1. อบภาชนะสำหรับหาความชื้นในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนอุณหภูมิของภาชนะเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

2. ทำซ้ำข้อ 1 จนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัมและจดบันทึก

3. ชั่งตัวอย่างใส่ภาชนะหาความชื้นซึ่งทราบน้ำหนักและบันทึกน้ำหนักที่แน่นอนของภาชนะและตัวอย่าง

4. นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมงนำออกจากตู้อบใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปล่อยทิ้งไว้จนอุณหภูมิของภาชนะเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนัก

5. ชั่งน้ำหนักภาชนะและตัวอย่างหลังจากนั้นนำกลับไปอบในตู้อบและทำซ้ำเช่นเดิมจนได้ผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งทั้งสองครั้งติดต่อกันไม่เกิน 1-3 มิลลิกรัมและจดบันทึก

วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น (ร้อยละ)} = \frac{(\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ-น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ})}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ}} \times 100$$

ภาคผนวก ค

ผลการทดลอง

Table 4 . Survival of probiotics before and after freeze-drying.

Freezing temperature		Probiotic Strains			
		L. acidophilus	*L. plantarum*	*B.bifidum*	*B. longum*
-20°C	before	9.03±0.10	9.22±0.34	6.07±0.07	8.34±0.02
	after	8.71±0.11	8.85±0.35	4.97±0.05	6.52±0.41
-80°C	before	9.03±0.10	9.22±0.34	6.07±0.07	8.34±0.02
	after	8.41±0.15	8.70±0.34	4.70±0.22	6.93±0.18
-196°C	before	9.82±0.13	9.74±0.10	6.61±0.10	8.55±0.07
	after	9.17±0.06	9.56±0.15	6.03±0.09	7.94±0.02

Table 5. Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract, corn extract, mungbean extract, FOS, sucrose glucose as carbon sources and non carbon source before and after freeze-dry.

Carbon source	log CFU/ml		% survival
	Before	After	
Without carbon source	9.16 ±0.02	8.60±0.02	93.85±0.37
Glucose	9.15±0.10	8.89±0.06	97.07±0.44
Sucrose	9.43±0.14	8.85±0.08	94.18±0.87
FOS	9.11±0.07	8.67±0.04	95.09±0.31
Soybean extract	9.04±0.02	8.93±0.04	98.72±0.58
Mungbean extract	9.25±0.05	9.13±0.09	98.72±0.62
Corn extract	9.03±0.08	8.87±0.14	98.30±0.65

Table 6. Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract as carbon sources and crude fiber 2 % from soybean, corn, mungbean(A and B), EPSs and control not crude fiber before and after freeze-dry.

Crude fiber	log CFU/ml		% survival
	Before	After	
Without crude fiber	9.08 ±0.01	8.56±0.04	94.29±0.44
soybean	9.05±0.07	8.32±0.06	92.01±0.16
corn	8.90±0.18	7.88±0.17	88.19±0.38
Mungbean A	9.34±0.02	8.90±0.04	95.29±0.29
Mungbean B	9.16±0.08	8.85±0.08	97.24±0.13
EPSs	8.95±0.08	8.64±0.06	96.08±0.13

Table 7. Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract as carbon sources and 2 % crude fiber from mungbean B and pH of medium such as 4, 5, 6.5 and 7 before and after freeze-dry.

pH	log CFU/ml		% survival
	Before	After	
pH 4	9.56 ±0.15	7.77±0.00	81.34±1.35
pH 5	9.90±0.29	8.68±0.32	87.70±0.73
pH 6.5	10.17±0.04	9.76±0.06	96.05±0.80
pH 7	9.92±0.05	8.89±0.10	89.60±0.62

Table 8. Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract as carbon sources, 2 % crude fiber from mungbean B, pH 6.5 and incubated at 30, 37 and 45°C before and after freeze-dry.

Temperature (°C)	log CFU/ml		% survival
	Before	After	
30	8.51 ±0.03	7.99±0.03	93.92±0.05
37	8.53±0.02	8.09±0.02	94.77±0.08
45	7.95±0.23	6.86±0.14	86.28±0.79

Table 9. Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract as carbon sources, 2 % crude fiber from mungbean B, pH 6.5, incubated at 37°C and harvested cell at late log phase, mid stationary phase and late stationary phase before and after freeze-dry

Growth phase	log CFU/ml		% survival
	Before	After	
Late log phase	8.86 ±0.01	8.67±0.02	97.84±0.24
Mid stationary phase	8.76±0.02	8.60±0.04	98.17±0.18
Late stationary phase	8.98±0.01	8.80±0.05	98.05±0.28

Table 10. Survival of *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 in MRS medium contained soybean extract as carbon sources, 2 % crude fiber from mungbean B, pH 6.5, incubated at 37°C, harveated cell at mid stationary phase and used various cryoprotectants before and after freeze-dry

cryoprotectant	log CFU/ml		% survival
	Before	After	
sucrose	7.99 ±0.00	7.79±0.05	97.54±0.68
Skim milk	8.06±0.00	7.71±0.01	95.75±0.05
FOS	8.06±0.00	6.81±0.10	84.45±1.30
EPSs	8.07 ±0.01	7.24±0.03	89.20±0.43
Soybean extract	7.79±0.02	6.88±0.05	81.36±0.68
Soybean crude fiber	7.98±0.01	6.49±0.10	89.20±1.31
Corn ex tract	8.00 ±0.01	7.74±0.01	96.81±1.43
Corn crude fiber	8.02±0.01	7.05±0.02	87.86±0.58
Mungbean extract	7.88±0.01	7.03±0.11	87.11±0.66
Mungbean crude fiberA	7.93±0.01	6.91±0.04	87.11±0.20
Mungbean crude fiberB	7.90±0.01	6.95±0.05	87.98±0.32

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวพัชรวรรณ รัตนอุบล

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4911020017

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ผลิตกรรมชีวภาพ)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2548

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

- ทุนอุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ (ประเภท ข) คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2550
- ทุนจากสถาบันวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Patcharawan Rattanaubon and Tipparat Hongpattarakere. 2008. Effect of Cereal Extracts and Fibers on Survival of *Lactobacillus plantarum* from Freeze-drying. The 9th National Graduate Research Conference. Burapha University, Bangsaen, Chonburi, Thailand. 14-15 March 2008. pp. 194.